

Università degli Studi di Milano

Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria

Laboratori di Farmacologia, Polo Universitario S. Paolo



Dottorato di Ricerca in
Fisiopatologia, Farmacologia, Clinica e Terapia
delle Malattie Metaboliche (XXIII ciclo)
Facoltà di Medicina, Chirurgia (BIO14)
Anno accademico 2009-2010

"Isolamento, caratterizzazione e trapianto in un modello murino di lesione spinale di cellule umane di liquido amniotico"

Tesi di Dottorato di:
EMANUELA NICORA

Matr. R07549

Coordinatore del Corso di Dottorato: Chiar.ma Prof.ssa A.M. Di Giulio

Docente Guida: Prof. Alfredo Gorio

INDICE

1.	INTRODUZIONE	1
1.1	LA MEDICINA RIGENERATIVA	1
1.2	LA LESIONE SPINALE	5
1.2.1	EPIDEMIOLOGIA E CLINICA	5
1.2.2	FISIOPATOLOGIA DEL TRAUMA SPINALE	8
1.2.3	MODELLI SPERIMENTALI PER LO STUDIO DELLA LESIONE SPINALE	14
1.2.4	TERAPIA FARMACOLOGICA	20
1.3	LA TERAPIA CELLULARE DELLA LESIONE SPINALE	24
1.4	LE CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO	34
2.	MATERIALI E METODI	43
2.1	ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO	43
2.1.1	ISOLAMENTO E COLTURA PRIMARIA	44
2.1.2	FIBROBLASTI	46
2.1.3	VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DEL CROMOSOMA Y	47
2.1.4	ESTRAZIONE DI RNA	48
2.1.5	RETROTRASCRIZIONE	49
2.1.6	REAL-TIME PCR E ANALISI DEI DATI	49
2.1.7	SAGGIO DELLA CAPACITA' PROLIFERATIVA	51
2.1.8	SAGGIO DELLA CAPACITA' DIFFERENZIATIVA	51
	-ADIPOGENESI	

-OSTIOGENESI

-NEUROGENESI

2.1.9 ANALISI IMMUNOCITOCHIMICA 54

2.1.10 ANALISI CITOFLUORIMETRICA 55

2.1.11 MISURAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI 56

2.1.12 ANALISI DEL CARIOTIPO 57

2.2 TRAPIANTO DELLE CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO *IN VIVO* 57

2.2.1 ANIMALI E GRUPPI SPERIMENTALI 58

2.2.2 LESIONE SPINALE E CURE POST-OPERATORIE 59

2.2.3 IMMUNOSOPPRESSIONE 60

2.2.4 MARCATURA DELLE CELLULE E TRAPIANTO 60

2.2.5 TEST COMPORTAMENTALI 61

2.2.6 IMMUNOISTOCHEMICA 62

2.2.7 VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI CELLULE POSITIVE AL Q-DOT E

CONTA

NELL'AREA DI LESIONE 64

2.2.8 LECTINA

3. RISULTATI 66

3.1. ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE DEL LIQUIDO
AMNIOTICO *IN VITRO* 66

3.1.1 ISOLAMENTO DELLE CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO:

MORFOLOGIA E CURVE DI CRESCITA 66

3.1.2 ORIGINE FETALE DELLE CELLULE ISOLATE 72

3.1.3 ANALISI DEL CARIOTIPO	72
3.1.4 MISURAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI	73
3.1.5 CARATTERIZZAZIONE DELLE COLTURE ISOLATE	75
-STUDI DI REAL TIME IN PCR	
-STUDI DI IMMUNOFLUORESCENZA	
-ANALISI CITOFLUORIMETRICA	
3.1.6 SAGGI DI DIFFERENZIAMENTO	85
-ADIPOGENESI	
-OSTEOGENESI	
-NEUROGENESI	
3.1.6 A ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DOPO DIFFERENZIAMENTO	87
3.2 STUDI <i>IN VIVO</i> E VALUTAZIONE DEL RECUPERO MOTORIO	88
3.2.1 ANALISI DEL RECUPERO MOTORIO NEGLI ANIMALI TRAPIANTATI CON AFCS	88
3.2.2 ANALISI DELLA PRESENZA DI CELLULE UMANE MARCATE NEL MIDOLLO DEI TOPI TRAPIANTATI	89
3.2.3 VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI MIELINA NELL'AREA DI LESIONE	92
3.2.4 MISURAZIONE DEI LIVELLI DI LECTINA	94
4. DISCUSSIONE	97
5. BIBLIOGRAFIA	112

1. INTRODUZIONE

1.1 LA MEDICINA RIGENERATIVA

Per molti anni le terapie rigenerative, che permettono di sostituire le cellule danneggiate o perdute in seguito a danno o a una patologia, con altre cellule provenienti sia dal medesimo (omologhe) che da altri (eterologhe) organismi umani sono state oggetto di intensi studi.

Gli interventi cellulari, utilizzati per sempre più patologie, sono derivati dalla consapevolezza che le terapie tradizionali non siano sufficientemente efficaci in particolare per quelle patologie che determinano la perdita di gran parte delle cellule dell'organo danneggiato. Organi o tessuti che non presentano la capacità di rigenerazione, come il sistema nervoso centrale, costituiscono quindi i principali bersagli della medicina rigenerativa.

L'approccio cellulare nei confronti di patologie nelle quali risultavano danneggiati tessuti normalmente non in grado di rigenerare, come quello nervoso, ha subito un grande sviluppo specialmente in modelli preclinici. Tra le patologie maggiormente trattate con questa strategia ricordiamo l'Alzheimer, il Parkinson, l'infarto, la Sclerosi Laterale Amiotrofica, la malattia di Huntington e, recentemente, la lesione spinale traumatica (Park et al, 2010; Schwartz and Schwarz, 2010). Quest'ultima patologia, pur non avendo un'alta incidenza, generalmente colpisce una fascia relativamente giovane di popolazione, determinando anche un notevole carico economico sia per il paziente stesso che per la società. Attualmente, non esiste un approccio efficace per il trattamento della lesione spinale (Baptiste et al, 2006; Hawryluk GWJ et al, 2008), eccetto alte dosi di metilprednisolone, che presenta però molti effetti

collaterali (quali alterazione del bilancio elettrolitico, ipertensione, insufficienza cardiaca, alterazioni muscolo scheletriche, complicazioni gastrointestinali, alterazioni neurologiche) e non impedisce comunque la disabilità irreversibile dell'attività motoria e sensoriale (Baptiste and Fehlings, 2006; Hawryluk et al, 2008).

La maggior parte degli studi quindi si sono focalizzati sullo sviluppo di nuove strategie di trattamento di tale patologia (Park D et al, 2010).

Le cellule staminali e i progenitori, che possono rigenerare tessuto nervoso, fornendo nuove possibilità di riparazione del tessuto danneggiato, possono derivare da varie fonti : staminali embrionali, iPS, staminali neurali, staminali mesenchimali (Fig.1.1).

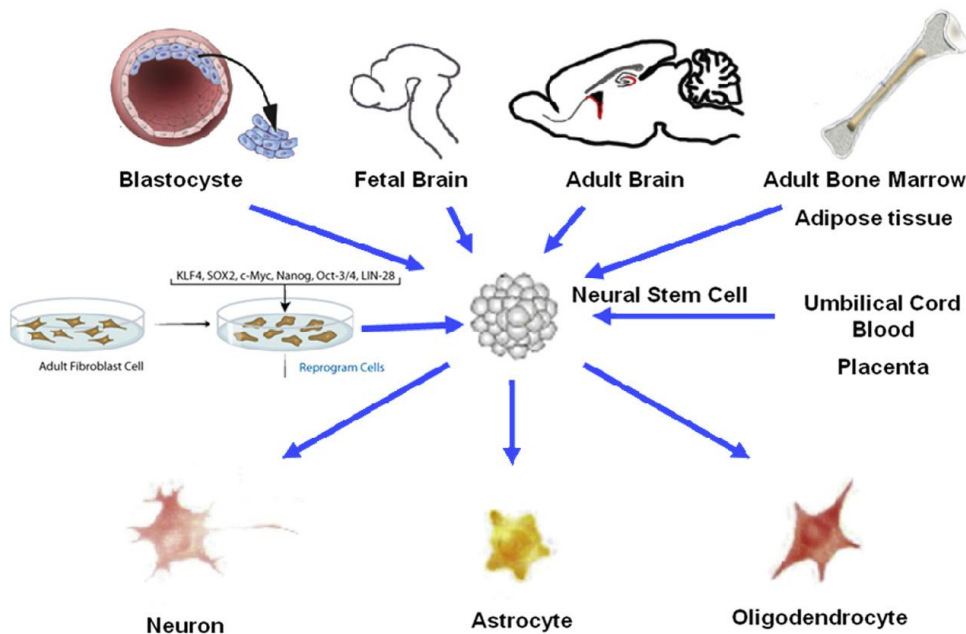


Fig.1.1: *Illustrazione di vari tipi cellulari che possono generare neuroni nella terapia delle malattie neurodegenerative. Le fonti più promettenti al momento, sono tessuto nervoso fetale e le iPS (tratta da Schwarz e Schwarz, 2010).*

Le cellule staminali embrionali (ESCs) originano dalla "inner cell mass" della blastocisti e hanno una capacità quasi illimitata di autorigenerazione. Presentano però, dopo il trapianto, anche un elevato potenziale teratogenico (Nussbaum et al, 2007; Reubinoff et al, 2000) e non è ancora chiaro quanto a lungo possano mantenere la loro stabilità genetica (Erdo F et al, 2003). Inoltre, il loro utilizzo comporta numerose problematiche etiche e giuridiche, che limitano il loro utilizzo in clinica.

Più recente è la tecnica di riprogrammazione di cellule somatiche adulte (Takahashi K and Yamanaka, 2006), che ha portato alla generazione di iPS (induced pluripotent stem cells), le quali possono costituire un'altra interessantissima fonte di cellule staminali neurali autologhe, che non presentano quindi complicazioni di tipo immunologico. Tuttavia anch'esse presentano il rischio della possibile formazione di tumori, e la loro sicurezza non può essere garantita (Schwartz and Schwartz, 2010).

Recenti studi hanno mostrato la possibilità di generare neuroni da cellule adulte, come i fibroblasti, mediante riprogrammazione diretta, senza passare dallo stadio intermedio di iPS (Lee et al, 2007). Se fosse possibile tramite questa via generare specifici neuroni maturi, come ad esempio neuroni dopaminergici, la necessità di cellule staminali o di progenitori potrebbe essere eliminata, aprendo nuovissime prospettive per la medicina rigenerativa.

Attualmente, le cellule staminali neurali umane (NSCs) derivate da tessuto fetale sembrano essere, come recentemente affermato in varie dichiarazioni pubbliche dal Prof. Angelo Vescovi, le più vicine all'applicazione clinica.

Il midollo osseo si è recentemente affermato come una fonte non solo di cellule staminali ematopoietiche ma anche di cellule indifferenziate capaci di dare origine a cellule dell'osso, della cartilagine, del tessuto adiposo e anche del tessuto nervoso; tra queste cellule ci sono le MAPCs (multipotent adult progenitor cells) e le staminali mesenchimali (Nandoe Tewarie et al, 2006). Poiché però il numero e la capacità proliferativa e differenziativa di queste cellule si abbassano notevolmente con l'età del donatore, si è cercato una fonte alternativa di cellule staminali stromali nel sangue del cordone ombelicale. Nonostante le cellule mesenchimali isolate dal sangue del cordone abbiano dato risultati positivi in alcuni studi sulla lesione spinale (Dasari et al, 2006), in uno studio effettuato nel nostro laboratorio gli animali trapiantati con queste cellule non hanno presentato un recupero funzionale significativamente superiore a quello dei topi di controllo.

Una fonte promettente ma ancora poco studiata di elementi indifferenziati, che da recenti lavori sembra possano dare origine anche a cellule neurali, è il liquido amniotico (De Coppi et al, 2007).

1.2 LA LESIONE SPINALE

Le lesioni spinali sono la prima causa di invalidità in Italia e, dal punto di vista assistenziale, sono una delle sfide più impegnative alla quale deve far fronte il sistema sanitario. Le conoscenze scientifiche su questa patologia sono aumentate drasticamente negli ultimi due decenni, ma ancora non si è trovata una risposta al problema principale: come rigenerare gli assoni interrotti o danneggiati e far riguadagnare la funzione (motoria, sensitiva, autonoma) sotto il livello della lesione.

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA E CLINICA

Negli Stati Uniti, gli effetti della lesione spinale sulla società e la salute pubblica sono devastanti. Circa 300.000 persone vivono con disabilità croniche legate alla lesione spinale, e ogni anno, i nuovi casi di lesione spinale sono circa dai 10.000 ai 14.000 (molti di età media intorno ai 30 anni). Il costo per la società è stimato essere pari a circa 8 miliardi di dollari all'anno e i costi per individuo, per i pazienti, sono stimati essere circa 1,35 milioni di dollari durante tutta la vita, e questi costi cresceranno proporzionalmente, poiché la nostra capacità di prolungare e migliorare la loro qualità di vita sta aumentando.

In Italia gli incidenti stradali rappresentano la causa più frequente di trauma vertebro-midollare, seguiti dalle cadute accidentali, gli infortuni sul lavoro, i traumi sportivi e le ferite da arma da fuoco. Tra le cause non traumatiche di lesione spinale ricordiamo le compressioni midollari, dovute per esempio a neoplasie, gravi cifoscoliosi, fratture vertebrali patologiche od ernie discali.

Altre cause non traumatiche di lesione spinale sono l'ischemia midollare, le mieliti e la siringomielia.

Le lesioni a livello cervicale sono più comuni di quelle a livello toracico e lombare, probabilmente perché la zona cervicale è più mobile rispetto alle altre zone. Per quanto riguarda i tipi di lesione i dati indicano che la tetraplegia incompleta rappresenta l'evento più comune, seguito da paraplegia completa, tetraplegia completa ed infine paraplegia incompleta.

Dal punto di vista clinico, immediatamente dopo il trauma si instaura una fase definita di shock spinale, che è caratterizzata dalla soppressione di tutte le funzioni sottolesionali con paralisi motoria, anestesia tattile e dolorifica, ritenzione urinaria e fecale. Alla fase di shock spinale fa seguito la ripresa di attività sottolesionale con caratteristiche estremamente variabili, in quanto la gravità del danno clinico dipenderà dal livello midollare della lesione (cervicale, dorsale, lombare) e dall'ampiezza della lesione (sezione completa o incompleta). La paralisi motoria ed i deficit sensitivi interesseranno tutti e quattro gli arti nelle lesioni cervicali (tetraplegia) ed i soli arti inferiori nelle lesioni dorsolombari (paraplegia). In entrambi i casi saranno presenti inoltre, in maniera più o meno grave, disturbi delle funzioni viscerali.

Le lesioni midollari possono essere complete o incomplete a seconda che ci sia l'abolizione, completa o parziale, di tutte le funzioni situate al di sotto del livello lesionale e normalmente controllate dai centri superiori, a causa dell'interruzione delle vie ascendenti e discendenti che collegano il midollo spinale al cervello. Quindi clinicamente nel primo caso non si avrà alcuna funzione motoria o sensitiva al di sotto della lesione, ed in fase acuta gli arti

saranno flaccidi, i riflessi osteo-tendinei saranno assenti e mancherà la motilità degli sfinteri; mentre nel secondo caso saranno ancora presenti dei segni di funzionalità midollare residua e la prognosi sarà significativamente migliore.

Le lesioni incomplete del midollo si possono presentare attraverso diversi quadri clinici a seconda del tratto interessato:

a) sindrome anteriore: consegue ad un danno ischemico nella porzione anteriore del midollo. E' caratterizzata da perdita della motilità con paresi/plegia degli arti e deficit della sensibilità tattile, dolorifica e termica ma con conservazione della sensibilità vibratoria e statochinestetica. Si parla in questi casi di sindrome del midollo anteriore. Tra le lesioni incomplete è quella con prognosi peggiore.

b) sindrome posteriore (molto rara): dolore e parestesie degli arti con modesti disturbi alla sensibilità.

c) sindrome di Brown-Sequard (o emisezione midollare) (piuttosto rara): è dovuta all'emisezione del midollo con interruzione crociata delle vie motorie e sensitive, si presenta con deficit unilaterale della motilità (emi, mono paresi/plegia) e della sensibilità profonda (proprioceettiva); nell'emisoma controlaterale si ha deficit della sensibilità termica e dolorifica ma conservazione della sensibilità tattile discriminativa: si parla di dissociazione della sensibilità.

Al momento non esiste un trattamento per recuperare le funzioni perdute, ma solo dei trattamenti volti a prevenire ulteriori danni nella fase acuta (metilprednisolone e chirurgia decompressiva) ed a rendere i pazienti il più

possibile indipendenti e attivi (terapia riabilitativa e apparecchiature che assistono il paziente nei gesti quotidiani).

1.2.2 FISIOPATOLOGIA DEL TRAUMA SPINALE

E' ormai ampiamente accettato il modello secondo cui il danno conseguente al trauma spinale si sviluppi in due fasi: ad una lesione primaria (diretta o meccanica), risultata dell'azione diretta della forza meccanica sul midollo spinale, segue una lesione secondaria (indiretta o molecolare), caratterizzata da una serie di processi biochimici e cellulari che si sviluppano in conseguenza del danno meccanico e che danno luogo alla progressiva distruzione del midollo spinale. Il danno secondario, che interessa principalmente neuroni e oligodendrociti, si estende progressivamente in direzione sia rostrale che caudale, a partire dal sito di danno.

I principali meccanismi di danno secondario comprendono distruzione del tessuto vascolare, ischemia, eccitotossicità glutammatergica, stress cellulare ossidativo, perossidazione lipidica e infiammazione, tutti eventi che scatenano il processo di apoptosi (Eftekharpour E. et al, 2008). I principali eventi che si sviluppano in seguito a lesione spinale sono riassunti nella tabella sottostante (Tab.1.1) e sono trattati in dettaglio in seguito.

TABLE 1. PATHOBIOLOGY OF ACUTE SPINAL CORD INJURY

Primary mechanisms
Compression
Contusion
Shear
Laceration
Acute stretching
Iatrogenic vertebral distraction
Acceleration-deceleration
Bone or disc displacement
Fracture-dislocation
Burst fracture
Secondary mechanisms
Systemic events
Systemic shock
Spinal shock
Hypoxia
Hyperthermia
Extracellular factors
Microcirculatory vascular damage
Ischemia
Hemorrhage
Tissue swelling
Cytokine-mediated inflammation
Intracellular factors
Ischemic cascade
Electrolyte shifts
Edema
Neurotransmitter excess
Glutamate excitotoxicity
Lipid peroxidation
Free radical injury
Neurotrophic factor deprivation
Apoptosis

Modified with permission from C.H. Tator & M.G. Fehlings (1999). Review of clinical trials of neuroprotection in acute spinal cord injury. *Neurosurgical Focus* 6(1):article 8.

Tab.1.1: Cascata di eventi scatenati dalla lesione spinale (da Baptiste.and Fehlings, 2006)

-Risposta neuronale e gliale al danno:

Neuroni e oligodendrociti sono molto vulnerabili alla morte cellulare secondaria dopo SCI. I neuroni hanno un alto tasso di metabolismo ossidativo, e questo fatto li rende suscettibili a danno da parte dei radicali liberi dopo ischemia.

In confronto alle cellule astrogliali di supporto, i neuroni hanno un più basso livello di antiossidanti, come il glutathione, e rispondono in modo diverso a meccanismi molecolari che coinvolgano l'attivazione di enzimi di fase II responsabili della neutralizzazione dei radicali liberi. Anche gli oligodendrociti sono molto sensibili all'azione dei radicali liberi, a causa del loro più alto contenuto di ferro e dei più bassi livelli di glutathione e dei suoi enzimi antiossidanti. I radicali liberi iniziano quindi una cascata di eventi ossidativi che portano a morte cellulare, dovuta ad una combinazione di necrosi e apoptosi, causando la degenerazione della materia grigia e la distruzione dei circuiti spinali locali nell'epicentro di lesione (Crowe MJ et al, 1997). Durante i primi giorni, fino a settimane dopo il danno ai neuroni danneggiati, gli assoni e gli elementi extracellulari della zona necrotica nel sito di danno vengono rimossi dalle cellule infiammatorie e dai fagociti, dando luogo, nel sito di lesione, alla formazione di cavità cistiche ripiene di liquido. Circa nel 30% dei pazienti, queste aree poi si espandono, dando luogo a siringomielia post-traumatica (Greitz D, 2006).

La gliosi deriva dall'attivazione delle cellule gliali, principalmente astrociti, in risposta alla lesione. Il conseguente aumento nell'espressione di GFAP, accompagnato da un aumento nella migrazione e proliferazione degli astrociti, la formazione di una cicatrice gliale (vedi in seguito) che si evolve nel tempo per contenere la lesione.

Anche se la reazione gliale può rappresentare per certi aspetti un fenomeno positivo, in quanto contiene l'estensione della lesione e contribuisce al ripristino della barriera ematoencefalica, i cambiamenti fenotipici nella popolazione astrocitaria sono principalmente inibitori nei confronti della rigenerazione degli assoni danneggiati (Eftekharpour et al, 2008).

A seguito dello shock spinale e dell'ischemia, si instaura una rapida deplezione delle riserve energetiche che porta ad un elevato consumo di ATP fino al suo esaurimento. Il metabolismo cellulare passa quindi da aerobio ad anaerobio e si verifica l'accumulo di acido lattico nel citoplasma, riducendo il pH. A questo va aggiunto il ruolo dello scambiatore $\text{Ca}^{2+}\text{-H}^+$ che continua a trasportare protoni nel citoplasma, contribuendo ad aumentarne l'acidità e favorendo così l'attività degli enzimi implicati nella produzione di radicali liberi dell'ossigeno.

Inoltre, a brevissimo tempo dalla lesione, a causa dell'aumento della permeabilità di membrana, il Ca^{2+} extracellulare penetra nelle cellule. Come conseguenza si ha necrosi a livello della sostanza grigia mentre la sostanza bianca risulta essere ancora preservata, in quanto i neuroni della sostanza grigia sono più sensibili alle alte concentrazioni di Ca^{2+} . L'aumento della concentrazione cellulare di Ca^{2+} è inoltre responsabile dell'attivazione delle proteasi e delle lipasi calcio-dipendenti come la fosfolipasi A2, la lipossigenasi, la ciclossigenasi e le mielinasi, la cui attività porta ad un danno a carico delle cellule nervose.

-Azione dei radicali liberi:

Dopo una lesione al midollo spinale la formazione di radicali liberi viene notevolmente incrementata dalla riperfusione sanguigna che segue la fase di shock spinale. I principali radicali liberi sono: l'anione superossido (O_2^-), il

perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale ossidrilico (OH^\cdot) ed il perossinitrito ($ONOO^\cdot$)

I radicali liberi dell' O_2 possono causare la perossidazione dei fosfolipidi di membrana, delle proteine cellulari e degli acidi nucleici, danneggiando in particolare le membrane dei neuroni e della glia, che sono ricche in acidi grassi ma hanno pochi enzimi e composti antiossidanti.

-Rilascio di amminoacidi eccitatori:

Il glutammato, il maggior neurotrasmettitore eccitatorio presente nel sistema nervoso centrale (SNC), è rilasciato in maniera incontrollata dopo la lesione ed il suo accumulo diventa dannoso per la cellula, in quanto l'eccessiva attivazione dei recettori del glutammato porta ad un aumento del Na^+ intracellulare, ad edema ed acidosi cellulare. Inoltre il legame del glutammato al recettore NMDA porta ad un massiccio ingresso di Ca^{2+} nella cellula contribuendo ulteriormente all'attivazione di proteasi, lipasi e mielinasi.

-Alterazione della barriera emato-encefalica:

La barriera emato-encefalica (BEE), chiamata anche barriera emato-spinale a livello del midollo spinale, rappresenta l'interfaccia di scambio dei soluti tra midollo spinale e circolo sanguigno. In caso di trauma spinale la continuità della BEE viene interrotta e la sua permeabilità ai soluti cambia, consentendo il passaggio di molecole dal peso molecolare più o meno elevato a seconda dell'intensità del danno subito. Il passaggio di soluti richiama l'acqua all'interno della BEE e porta alla formazione di edema a livello del canale ependimale o a livello della sostanza bianca tra la dura e la pia madre. La conseguenza è che il tessuto nervoso viene ulteriormente compresso e quindi soggetto ad un aggiuntivo danno meccanico.

E' stato inoltre dimostrato che l'alterazione della BEE porta ad un'attivazione degli astrociti che sono in continuità con essa influenzandone la loro funzionalità.

-Processo infiammatorio:

L'influsso di Ca^{2+} nei neuroni provoca l'attivazione delle fosfolipasi con conseguente idrolisi dei fosfolipidi di membrana e liberazione di acidi grassi. Tra questi, notevole importanza ha l'acido arachidonico che viene rapidamente convertito in prostaglandine (PG) e trombossani (TBX) dalla ciclossigenasi ed a leucotrieni (LCT) dalla lipossigenasi. Le PG svolgono un'azione chemiotattica nei confronti dei neutrofili e macrofagi; inoltre alcune di esse, in particolare la $\text{PGF}_2\alpha$, hanno un effetto vasocostrittore che contribuisce allo sviluppo dell'ischemia midollare. I LCT e le PG aumentano anche la permeabilità dell'endotelio promuovendo la formazione dell'edema.

I neutrofili sono le prime cellule infiammatorie ad arrivare nel sito di lesione, il loro accumulo è significativo entro 3 ore dall'evento traumatico e persiste per almeno 3 giorni durante i quali essi si accumulano a livello dell'endotelio vascolare. Caratteristicamente, il numero dei neutrofili infiltranti è molto più alto nel midollo spinale rispetto all'encefalo; ciò può essere dovuto ad una maggiore espressione a livello dell'endotelio del midollo spinale della molecola di adesione intracellulare ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) e della molecola di adesione cellulare piastrine-endotelio PECAM (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule). I neutrofili partecipano alla lesione secondaria rilasciando specie reattive dell'ossigeno e proteasi tra cui l'elastasi, che è in

grado di danneggiare le cellule endoteliali e aumentare così la permeabilità vascolare.

L'attivazione post-traumatica della microglia è già evidente al primo giorno, ed il numero di cellule microgliali attivate aumenta durante i primi 7 giorni raggiungendo un plateau tra le 2 e le 4 settimane dopo la lesione. I macrofagi e la microglia attivata secernono sostanze citotossiche tra cui varie citochine, come il Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) e l'interleuchina 1 (IL-1), radicali liberi dell'ossigeno ed ossido nitrico.

Il numero di linfociti aumenta progressivamente entro la prima settimana dal trauma e prevalentemente all'epicentro della lesione, ma rimane comunque basso rispetto alle altre cellule infiltranti il parenchima midollare.

Le citochine pro e anti-infiammatorie giocano un ruolo importante nel processo infiammatorio che si sviluppa dopo la lesione spinale. Già pochi minuti dopo il trauma i livelli di parecchie citochine pro-infiammatorie come TNF- α , IL-1 β e IL-6 possono essere rilevati nel sito di lesione. Le citochine sono prodotte dalle cellule infiammatorie che entrano nel SNC in seguito all'alterazione della barriera ematoencefalica e dallo stesso SNC tramite la microglia attivata e gli astrociti, ma anche i neuroni sono in grado di produrre IL-6 e TNF- α . Si è inoltre scoperto che le cellule endoteliali possono produrre IL-6 in risposta agli stimoli pro-infiammatori.

Il TNF- α è una citochina prodotta principalmente dalle cellule immunitarie attivate ed i macrofagi ne costituiscono la maggior fonte. Il TNF- α altera l'integrità della BEE inducendo l'espressione di molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali e promuovendo quindi la fuoriuscita dai vasi

di neutrofili, linfociti e monociti. L'iniezione a livello midollare di TNF- α provoca un aumento dell'infiltrazione neutrofila; sembra inoltre che il TNF- α contribuisca all'apoptosi neuronale e gliale a causa dei cambiamenti secondari indotti dall'aumento della permeabilità della BEE.

Nel midollo lesionato, la fonte più abbondante di IL-1 β sembra essere la microglia attivata, a differenza di TNF- α e IL-6 che vengono sintetizzati principalmente dagli astrociti.

Al contrario delle precedenti citochine, IL-10 è una potente citochina antiinfiammatoria che sopprime la maggior parte delle risposte della microglia e dei macrofagi, attenua la sintesi di varie citochine, chemochine e proteasi della matrice, riduce la produzione di TNF- α e la presentazione antigenica da parte degli astrociti e della microglia. Ha effetto anche sulla BEE, prevenendo l'adesione e la fuoriuscita dei leucociti dai vasi.

Infine l'interleuchina 8 (IL-8) costituisce un importante stimolo alla migrazione ed all'accumulo di neutrofili ed è prodotta dai macrofagi e dalle cellule endoteliali.

-Metalloproteasi:

Si tratta di una famiglia di endopeptidasi che media la degradazione della matrice extracellulare. La MMP-9 è espressa prevalentemente dalle cellule infiammatorie e la sua espressione aumenta rapidamente dopo la lesione raggiungendo un picco al primo giorno. In seguito ad un trauma, le metalloproteasi sembra giocare un ruolo peggiorativo sulla lesione in quanto portano alla degradazione della membrana basale dei vasi ed alla distruzione

della BEE, causando infine edema, emorragie e promozione dei fenomeni infiammatori.

1.2.3 MODELLI SPERIMENTALI PER LO STUDIO DELLA LESIONE SPINALE

La lesione spinale è una patologia molto complessa e varia, dal punto di vista eziologico, patologico e dei danni funzionali che da essa conseguono. Tuttavia lo studio di tale patologia servendosi di un modello animale è necessario, in parallelo agli studi clinici.

La ricerca nel campo della lesione spinale mediante lo studio dei modelli animali ha portato a comprendere più a fondo i processi che aggravano il danno nella fase sub-acuta e che impediscono la rigenerazione neurale, in modo da poter contrastare questi meccanismi. Altri studi sperimentali hanno cercato un trattamento per la fase cronica, volto a ripristinare, anche solo parzialmente, la funzione neurologica perduta.

Generalmente gli studi di base sulla lesione spinale vengono condotti sui roditori, soprattutto topi e ratti, anche se non mancano studi su altri animali, come gatti o scimmie. Ci sono tre principali modelli di lesione spinale comunemente usati nei roditori: la transezione, la compressione e la contusione (Stokes BT and Jakeman LB, 2002). Nella transezione viene aperta la dura madre e tagliato tutto od una sola parte del midollo. Si può anche rimuovere una porzione di midollo. Il vantaggio di questo modello è che si ha il controllo preciso dell'estensione della lesione, lo svantaggio è che non rispecchia la maggior parte delle lesioni spinali nell'uomo, che sono da compressione o contusione (Steward et al, 2003). La compressione viene

ottenuta applicando sul midollo esposto una clip da aneurisma od un peso. In alcuni studi viene tagliata la dura madre e gonfiato subduralmente un palloncino (Rosenzweig and McDonald, 2002). Infine le lesioni da contusione vengono indotte colpendo il midollo esposto con un apparecchio che applica una forza sulla zona da lesionare (Scheff et al, 2003). Nonostante sia stato sviluppato negli ultimi anni un apparecchio (Infinite Horizon Device) col quale lo sperimentatore può monitorare l'entità della forza da applicare, il tempo in cui è applicata tale forza e lo spostamento che il pistone compie una volta toccato il midollo, le lesioni da compressione e contusione non offrono il controllo preciso della localizzazione e dell'estensione del danno.

Questi tre modelli possono quindi fornire informazioni complementari sulla lesione spinale.

Nell'utilizzo di modelli animali per lo studio della lesione spinale bisogna tener presente però alcuni fattori: le risposte morfologiche, nell'uomo, in seguito al danno, sono qualitativamente molto simili a quelle osservate nei roditori, ma tuttavia ci sono, tra le specie, sostanziali differenze, da tener presente.

La componente infiammatoria nell'uomo, ad esempio, è molto meno pronunciata che nell'animale, con solo una minima risposta da parte dei neutrofili; la risposta infiammatoria mediata dalle citochine, invece, è molto simile a quanto si può osservare nel ratto (Yang et al, 2004). Nell'uomo inoltre la risposta astrogliale è notevolmente ritardata e ridotta rispetto ai roditori e si ha la formazione di una cicatrice gliale di dimensioni ridotte (Buss et al, 2004). Inoltre, proteoglicani legati a condroitin solfato (CSPGs) sono espressi dopo la lesione spinale, ma sono primariamente associati con altre cellule, non gli

astrociti. Inoltre, la proliferazione delle cellule di Swann è presente nell'uomo, ma meno che nei roditori, e la degenerazione Walleriana nell'uomo si protrae molto a lungo, anche per anni dopo la lesione.

Nell'uomo inoltre, come anche negli animali, ci sono alcune evidenze di rigenerazione endogena, principalmente nelle vie afferenti sensoriali e di remielinazione da parte delle cellule di Swann (Hagg T and Houdega M, 2006). Le analogie e le differenze nella risposta al danno, tra uomo e roditori, sono riassunte nella tabella sottostante (Tab.1.2)

REGENERATIVE PROCESSES AFTER SCI

TABLE 1. SIMILARITIES AND DIFFERENCES BETWEEN THE HUMAN AND RODENT SPINAL CORD IN RESPONSE TO INJURY

	<i>Rodent</i>	<i>Human</i>
Degenerative processes		
Vascular response	Hemorrhage, angiogenesis	Hemorrhage, angiogenesis
Inflammation	Extensive	Much less pronounced, despite similar cytokine expression
Demyelination	Yes	Yes, but perhaps less pronounced
Axonal degeneration	Some die-back and Wallerian degeneration	Wallerian degeneration much more protracted
Glial scar	Extensive, with astroglial CSPG	Not extensive, CSPGs mostly in blood vessels
Cyst formation	Rat yes; mouse no	Yes
Schwann cell response	Some invasion	Extensive Schwannosis
Regenerative processes		
Sprouting	Yes	Yes
Remyelination	Yes	Yes
Plasticity of uninjured systems	Yes	Yes

CSPG, chondroitin sulphate proteoglycan.

Tab.1.2: Processi rigenerativi dopo la lesione spinale (da Hagg T and Houega M, 2006)

Bisogna però tenere sempre presente che i modelli descritti in precedenza rimangono comunque modelli sperimentali, nei quali, l'entità del danno e il livello a cui avviene devono essere necessariamente standardizzati e, come tali, non mimano esattamente la reale incidenza del danno nell'uomo. Nella

maggior parte degli incidenti, infatti, l'impatto avviene generalmente a livello ventrale, con conseguente compressione del midollo all'interno del canale vertebrale, un canale chiuso, a differenza di quanto avviene in laboratorio, in cui l'impatto è effettuato sulla parte dorsale del midollo, esposto in seguito a laminectomia. Si può concludere che se il trattamento non è efficace in tali modelli sperimentali semplificati di danno, non sarà probabilmente efficace nelle situazioni reali di lesione, quasi sempre più gravi e complesse. In caso contrario, il trattamento sarà testato su una grande varietà di modelli animali e situazioni sperimentali più complesse, prima di arrivare fino all'uomo.

1.2.4 TERAPIA FARMACOLOGICA

Ci sono diversi approcci alla terapia farmacologica delle lesioni spinali, che possono essere riassunti in due principali campi: la neuroprotezione e la rigenerazione neurale.

-Terapie neuroprotettive:

Per neuroprotezione si intendono tutte le misure volte a contrastare e/o limitare i meccanismi secondari di danno. Il metilprednisolone sodio succinato (MPSS) è il farmaco più studiato in questo campo: nei modelli animali ha mostrato la capacità di ridurre la formazione dell'edema, di radicali liberi e la degenerazione nervosa (Anderberg et al, 2007). In una serie di studi clinici, il MPSS è stato somministrato da solo o in combinazione con altri agenti come il naloxone (antagonista oppioide) ed il tirilazad-mesilato (inibitore della perossidazione lipidica). Altri farmaci che in base ai benefici effetti osservati negli esperimenti sugli animali sono stati testati in studi clinici sono il ganglioside GM1, l'ormone di rilascio della tireotropina (TRH) e la Nimodipina

(calcio-antagonista) (Baptiste and Fehlings, 2006). Sebbene nessuno di questi studi abbia mostrato effetti clinici significativi, il MPSS è ancora oggi somministrato entro otto ore dalla lesione come agente neuroprotettivo (Apuzzo ML, 2002). Un problema ancora irrisolto per il trattamento nella fase acuta riguarda la cosiddetta finestra terapeutica, ovvero entro quanto tempo dalla lesione bisogna somministrare il farmaco affinché sia efficace.

A causa dello scarso successo ottenuto con l'approccio neuroprotettivo, la ricerca si è maggiormente focalizzata sulla rigenerazione neurale, che è volta a ripristinare nella fase sub-acuta e cronica della lesione spinale la funzione neurologica perduta. Di seguito sono elencate alcune delle terapie sviluppate con questo scopo.

-Blocco delle molecole inibenti la ricrescita assonale:

Il sistema nervoso centrale presenta una serie di meccanismi che ostacolano la ricrescita degli assoni. Questi includono gli inibitori della crescita assonale NOGO-A, MAG (myelin associated glycoprotein) e OMP (oligodendrocyte myelin glycoprotein), prodotti dagli oligodendrociti, e tutti i fattori prodotti dagli astrociti e dalla microglia che accelerano la formazione del tessuto cicatriziale (Fawcett JW, 2006). NOGO-A esercita il suo effetto inibitorio legandosi a specifici recettori posti sulla superficie degli assoni (Yamashita et al, 2005). Studi sperimentali condotti somministrando anticorpi anti NOGO-A o antagonisti del suo recettore hanno però prodotto risultati contraddittori, in quanto alcuni ricercatori hanno riportato un sostanziale aumento della rigenerazione assonica e un recupero funzionale, mentre altri hanno osservato addirittura un aumento del danno strutturale, con un peggioramento anche

motorio (Huang et al, 1999; Jones et al, 2004). Sono in corso studi clinici di fase I per valutare l'efficacia di anticorpi anti NOGO-A su pazienti con lesione spinale a livello toracico (Thuret et al, 2006).

La formazione di tessuto cicatriziale rappresenta un altro ostacolo alla ricrescita assonica. Oltre all'ostacolo meccanico, la cicatrice rappresenta una barriera chimica a causa della presenza di proteoglicani e collagene. Il proteoglicano condroitin solfato contribuisce in maniera preponderante alla formazione della cicatrice e quindi all'incapacità degli assoni di rigenerarsi a cavallo della lesione (Bush and Silver, 2002). Per contrastare questo fenomeno, si è tentata la somministrazione di condroitinasi ABC, un enzima batterico che digerisce questi proteoglicani e ciò ha portato, in modelli animali, ad una riduzione nella formazione della cicatrice gliale e ad un aumento della rigenerazione assonale (Bradbury et al, 2002).

-Modulazione del sistema immunitario:

La modulazione del sistema immunitario potrebbe costituire un'utile strategia per migliorare la rigenerazione dell'assone e la sopravvivenza dei neuroni (Andersson AJ, 2002). Per esempio in alcuni lavori sono stati somministrati anticorpi anti-ICAM, che è una molecola di adesione importante nelle prime fasi della risposta infiammatoria (Mabon et al, 2000), oppure è stata data l'interleuchina 10, una citochina che attenua la risposta infiammatoria (Brewer et al, 1999).

-Eritropoietina:

L'EPO è considerata un potente agente neuroprotettivo in quanto diminuisce la perossidazione lipidica e previene l'apoptosi (Gorio et al, 2002). Attualmente

sembra che la somministrazione entro 24 ore dalla lesione di carbamil EPO, una sostanza che presenta l'effetto neuroprotettivo senza agire anche sull'ematopoiesi, riduca i deficit neurologici negli animali trattati rispetto ai controlli (Sonmez et al, 2007).

-Rilascio di fattori di crescita:

Sono stati caratterizzati numerosi fattori di crescita in grado di promuovere la sopravvivenza neuronale e la ricrescita assonica. Fra questi, i meglio studiati sono NGF (nerve growth factor), NT-3 (neurotrophin 3), BDNF (brain derived neurotrophic factor), FGF (fibroblast derived growth factor) e GDNF (glia cell derived neurotrophic factor). Queste citochine non passano la BEE, per cui potrebbero venir somministrate attraverso l'impianto di sistemi a lento rilascio o mediante il trapianto di cellule geneticamente modificate che ne produrrebbero grandi quantità *in situ* (Anderberg et al, 2007). Il rilascio in vivo dei fattori di crescita potrebbe inoltre avvenire tramite un vettore virale (Bliz and Bunge, 2006). Bisogna però ancora chiarire quando somministrare queste molecole ed eventualmente in quale ordine, poiché ciascuna neurotrofina agisce in determinati stadi del processo riparativo e se somministrate in maniera erranea potrebbero anche interferire tra loro (Novikova et al, 2002).

-Ripristino della trasmissione del segnale:

Infine i bloccanti dei canali del potassio possono essere usati per favorire la trasmissione del segnale attraverso gli assoni demielinizzati. Infatti in questi assoni l'assenza della guaina mielinica provoca l'esposizione dei canali del potassio e la fuoriuscita dello ione nello spazio extracellulare, con conseguente

impedimento della propagazione del potenziale d'azione. Studi clinici di fase II stanno ora valutando l'efficacia della Fampridina (4-Aminopiridina), un bloccante del canale del potassio voltaggio-dipendente, nel miglioramento della spasticità in persone con danno cronico al midollo spinale (Cardenas et al, 2007).

Agli interventi terapeutici molecolari finora descritti si aggiunge poi la terapia cellulare, che può perseguire vari scopi, tra cui permettere agli assoni di superare la cisti o la cicatrice formatasi, sostituire le cellule morte e creare un ambiente favorevole alla rigenerazione neurale.

1.3 LA TERAPIA CELLULARE DELLA LESIONE SPINALE

La morte cellulare è una conseguenza inevitabile dopo la lesione spinale traumatica. All'interno del midollo spinale dell'organismo adulto sono contenute cellule staminali/progenitori, chiamati collettivamente neural precursor cells (NPCs), che sono responsabili del normale turnover delle cellule del SNC; l'attività proliferativa di tali cellule, però, è troppo limitata per supportare una significativa riparazione del tessuto danneggiato dopo lesione spinale, così sono state tentate varie strategie di trapianto in modelli animali di lesione spinale (Eftekharpour et al, 2008).

La terapia cellulare "sostitutiva" ha due obiettivi principali: 1-rigenerazione, che ha l'obiettivo di sostituire i neuroni persi o danneggiati e indurre rigenerazione o plasticità neuronale; 2-riparo, in quanto mira a sostituire cellule con funzione di "supporto", con oligodendrociti, per indurre remielinazione o prevenire la perdita progressiva di mielina. Inoltre, il trapianto

cellulare può promuovere la protezione delle cellule endogene da un ulteriore danno secondario.

Qui di seguito è indicata una panoramica della terapia cellulare effettuata dopo lesione spinale (Tab.1.3).

Table 1

Donor tissues or cells that have been used for CNS regeneration.

Tissues	Peripheral nerve tissue Fetal spinal cord or brain tissue
Primary neurons	Fetal brain or spinal cord neurons PNS neurons (e.g. sympathetic dopaminergic neurons)
Glial cells	CNS: astrocytes, oligodendrocytes, microglia PNS: Schwann cells, olfactory ensheathing glia (OEG)
Genetically engineered cells	Derived from neurons and glial cells Derived from non-neuronal cells (e.g. fibroblasts)
Stem cells	Embryonic stem (ES) cells Neural stem cells (NSCs) Glial-restricted precursors (GRPs)/oligodendrocyte progenitor cells (OPCs)
Non-neural cells	Marrow stromal cells (MSCs) Reactive macrophages Meningeal fibroblasts

Tab.1.3: Tessuti e tipi cellulari che sono stati utilizzati per la rigenerazione del SNC (da Xu X et al, 2009)

-Trapianto di cellule o tessuti che fungano da supporto per la ricrescita assonica:

Gli assoni danneggiati sono incapaci di attraversare l'area di lesione una volta che si è formata la cicatrice e/o la cisti, per cui necessitano di essere guidati

attraverso o attorno questo ostacolo meccanico mediante una struttura di supporto. A questo scopo, spesso in combinazione con dei fattori di crescita, sono stati usati espianti di nervo periferico (Lea et al, 2002), le cellule di Schwann (Xu et al, 1997) e le cellule della mucosa o del bulbo olfattorio (Li et al, 2003). Queste terapie hanno portato nei modelli animali a ricrescita assonale attraverso la lesione ed a recupero sensomotorio, mentre negli studi effettuati sull'uomo, per esempio un trial clinico di fase I nel quale sono state utilizzate cellule autologhe della mucosa olfattoria, non ci sono stati dei miglioramenti motori (Feron et al, 2005).

-Trapianto di cellule staminali:

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate che, in risposta a determinati stimoli, sono in grado di proliferare e dividersi dando origine sia ad altre cellule indifferenziate (automantenimento) che a progenitori cellulari che possono a loro volta differenziare in uno o più tipi cellulari. Finora sono stati testati numerosi tipi di staminali nei modelli animali di lesione spinale, tra cui ricordiamo le staminali embrionali, le staminali neurali, le staminali mesenchimali, cellule della mucosa olfattoria ed, infine, cellule staminali endogene e progenitori.

-Cellule staminali embrionali e da tessuto fetale:

Le cellule staminali embrionali umane derivano da embrioni non impiantati generati per la procreazione assistita. Entro pochi giorni dalla fecondazione *in vitro*, queste cellule possono essere prelevate dalla *inner cell mass* della blastocisti e propagate in determinati terreni di crescita, dove esse possono proliferare indefinitamente. Data la complessità del SN e l'importanza degli elementi non neuronali, la totipotenzialità delle cellule staminali embrionali le rende candidati

ottimali per la terapia cellulare, in quanto possono differenziare in tutti i tipi cellulari, per la riformazione di un network cellulare. Esse, dopo trapianto, mostrano l'espressione di marcatori caratteristici delle cellule endoteliali, gliali, e di differenti sottotipi neuronali (Eftekharpour E et al, 2008). Recenti lavori sulla generazione di motoneuroni funzionalmente efficienti in modelli sperimentali di patologie quali la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), hanno mostrato risultati promettenti (Nayak MS et al, 2006).

Le metodiche con cui sono state utilizzate le cellule embrionali o fetali per trattare le malattie neurodegenerative sono varie: per esempio, sono state trapiantate cellule staminali embrionali indifferenziate (Riess et al, 2007), oppure precursori neurali (Mitsui et al, 2005), gliali (Cao et al, 2005) o staminali neurali (Keirstead et al, 2005) derivate da staminali embrionali o da tessuto fetale, o ancora si è utilizzato tessuto fetale spinale (Akesson et al, 2001).

L'utilizzo di cellule staminali embrionali comporta però, come noto, innumerevoli problematiche etiche, oltre ad altre problematiche legate all'immunogenicità delle cellule differenziate e il rischio di tumorigenesi.

-Cellule staminali neurali:

Cellule staminali neurali endogene sono presenti all'interno del SNC dei mammiferi superiori e, recentemente, molti gruppi hanno isolato e coltivato con successo cellule staminali neurali da specifiche regioni del cervello adulto e in via di sviluppo, dal midollo spinale e dal nervo ottico (Reynolds and Weiss, 1992; Uchida et al, 2000; Mayer-Proschel et al, 1997; Shi et al, 1998). Si crede che tali cellule abbiano già un indirizzo neurale, quindi avrebbero minore probabilità delle cellule staminali embrionali di diventare neoplastiche.

Le NSC rappresentano una fonte di cellule immature capaci di proliferare, automantenersi e dare origine a cellule ristrette alla linea neuronale e gliale. Le CSN isolate dal SNC, fetale o adulto, sono in grado di proliferare *in vitro* in risposta a particolari fattori di crescita, come il bFGF (basic fibroblast growth factor) e l'EGF (epidermal growth factor), e di differenziare verso un fenotipo neuronale e gliale quando sottoposte a specifici stimoli.

Negli ultimi anni sono state prodotte colture di CSN da varie specie, tra cui l'uomo, allo scopo di testarne l'effetto terapeutico in modelli animali di malattie neurologiche, come il Parkinson, la lesione spinale e la sclerosi multipla: *in vivo* queste cellule hanno mostrato la capacità di migrare e di formare connessioni con i neuroni circostanti (Bottai et al, 2003).

Ci sono comunque ancora parecchi ostacoli che limitano l'uso terapeutico delle CSN nelle malattie umane, primo fra tutti la fonte. Infatti queste cellule possono essere estratte o da tessuto fetale, oppure da tessuto cerebrale proveniente da resezioni chirurgiche (Johansson et al, 1999) o da cadavere (Sanai et al, 2004). Inoltre dagli esperimenti condotti sui modelli animali si è visto che la sopravvivenza a lungo termine delle CSN trapiantate ed il loro differenziamento in determinati tipi cellulari neurali sono ancora inadeguate per attuare una valida terapia sostitutiva (Enzmann et al, 2006).

-Cellule staminali mesenchimali:

Le cellule mesenchimali (MSC), le cellule mononucleate del midollo osseo e il sangue del cordone ombelicale sono potenziali fonti ricche di cellule staminali e un numero rilevante di studi ha utilizzato tali cellule per trattare il danno al SNC. Esse infatti risultano facilmente ottenibili, permettono il trapianto autologo, possono

essere immuno-privilegiata, e sono in grado di migrare verso aree di danno e infiammazione.

Alcuni di tali studi hanno dato risultati promettenti, anche se la conoscenza di base riguardo al loro meccanismo d'azione e il loro potenziale terapeutico sia ancora lacunosa.

Nonostante ciò, sono in corso trials clinici che utilizzano tali cellule (Yoon et al, 2007; Callera and do Nascimento, 2006).

In studi comparativi è stato confrontato l'utilizzo di questo tipo di cellule staminali per la riparazione del SNC (Parr et al, 2007, Enzmann et al, 2006). In questi lavori vengono però comparati studi condotti partendo da materiali di partenza grandemente eterogenei, modelli di lesione molto differenti, vari regimi di immunosoppressione e metodi di trapianto.

La maggior parte di questi studi mostra che, a vari tempi dopo il trapianto, si ha un miglioramento della funzione motoria e il differenziamento delle cellule in oligodendrociti e, meno frequentemente, in neuroni (Coutts M et al, 2008). A differenza di ciò, invece, in altri studi si sono ottenuti risultati discordanti, in quanto non si era osservata traccia di transdifferenziazione, nonostante fosse presente un recupero motorio (Koda et al, 2005). Tali risultati sono dovuti al fatto che il differenziamento delle cellule MSC e delle cellule staminali da midollo osseo è determinata dall'ambiente. Inoltre, oltre a sostituire direttamente oligodendrociti e neuroni danneggiati, le cellule MSC e le cellule del midollo osseo potrebbero svolgere un importante ruolo di supporto dopo trapianto: esse infatti potrebbero creare un ambiente più favorevole alla limitazione del danno e alla promozione della rigenerazione per mezzo di immunoregolazione, espressione di fattori di

crescita e citochine, un aumento della vascolarizzazione, e fornendo un ambiente favorevole alla crescita e impedendo la formazione della cavità (Coutts et al, 2008).

Le cellule MSC sono state trapiantate in letteratura, oltre che allo stato nativo, anche dopo modificazione genetica (Lu et al, 2005; Lu et al, 2004).

-Cellule della mucosa olfattoria:

Le cellule della mucosa olfattoria (OECs) sono cellule di supporto che circondano gli assoni olfattori e facilitano la loro rigenerazione durante l'arco della vita dei mammiferi. Tali cellule, relativamente facili da isolare da biopsie nasali, sembrano avere una notevole plasticità e, inoltre, permettono ai neuroni di attraversare la cicatrice gliale e il limite tra SNP e SNC (Richter and Roskams, 2008; Raisman and Li, 2007).

Nell'ultimo decennio, OECs sono state utilizzate in molti e differenti modelli di lesione spinale acuta e cronica e, in alcuni casi, la remielinazione degli assoni e la rigenerazione degli assoni danneggiati è stata riportata con un sorprendente recupero funzionale (Coutts M, Keirstead HS, 2008).

Altri gruppi non sono stati in grado di riprodurre questi risultati, in parte a causa di differenze nelle proprietà biologiche delle colture primarie di OECs, che cambiano con il crescere dell'età delle cellule e/o del numero di passaggi (Pastrana et al, 2006). La maggior parte dei lavori sostiene che tali cellule facilitino il processo di rigenerazione dopo la lesione, ma tuttavia non ci sono evidenze della rigenerazione di lunghi tratti assionali; inoltre non è ancora chiaro se esse possano essere espanse in numero sufficiente per essere trapiantate.

-Cellule staminali endogene e progenitori:

Cellule staminali neurali sono presenti nel midollo spinale adulto, tuttavia, la capacità delle cellule staminali neurali endogene di rigenerare le cellule perdute è limitata. Anche la rigenerazione assonale da neuroni preesistenti è limitata, ed è probabile che molti dei fattori che prevengono la rigenerazione assonale inibiscano anche la funzione delle NSC endogene, dei progenitori neurali e neuroni maturi. Tra questi fattori ci sono: la formazione della cicatrice gliale, la mancanza di fattori neurotrofici, proteoglicani solfati inibitori e molecole inibitorie associate alla mielina (Ramer et al, 2005; Fitch et al, 2008). Anche la diminuzione dei livelli di cAMP può inibire la rigenerazione delle cellule e il differenziamento dei progenitori (Pearse et al, 2004).

Al contrario di ciò, invece, la rigenerazione gliale dopo danno al SNC avviene con successo. I precursori di oligodendrociti endogeni sono in grado di proliferare e differenziare, in risposta a vari tipi di danno e la divisione cellulare è un prerequisito per la remielinazione. Mentre gli oligodendrociti proliferano e si differenziano in risposta al danno, c'è una netta perdita di mielina (Guest et al, 2005)

La remielinazione è meno efficiente con l'aumentare dell'età e dopo ripetuti episodi di demielinazione e, inoltre, è possibile che la deplezione di progenitori mielinogenici contribuisca all'insuccesso nella remielinazione, in quanto oligodendrociti maturi non sono in grado di rimielinare gli assoni. L'astrogliosi potrebbe inoltre contribuire all'insuccesso nella remielinazione, formando una barriera fisica e bloccando l'accesso ai precursori degli oligodendrociti verso gli assoni demielinati (Coutts M, 2008).

In aggiunta, oltre a sostituire direttamente i neuroni e gli oligodendrociti danneggiati, le terapie con le cellule staminali potrebbero anche giocare un ruolo indiretto, svolgendo funzione di supporto delle cellule staminali endogene. Le cellule trapiantate potrebbero fornire fattori trofici o fornire un substrato permissivo per la crescita, differenziamento e connessione con le altre cellule (Zhang et al, 2006).

-Cellule staminali derivate dalla pelle:

La pelle contiene differenti cellule staminali derivate dallo strato germinativo dell'epidermide, dal follicolo pilifero e, come recentemente proposto, dal derma. Quest'ultimo compartimento sembra contenere, sia nei roditori (Toma et al, 2001) che nell'uomo (Toma et al, 2005), delle cellule multipotenti, chiamate SKP (skin-derived precursors), capaci di produrre *in vitro* sia cellule mesodermiche che neurali, tra cui neuroni, glia e cellule di Schwann. Ultimamente, Toma e collaboratori hanno ipotizzato che queste cellule derivino da precursori della cresta neurale che migrano nella pelle durante l'embriogenesi e persistono nella vita adulta in specifiche nicchie del derma, proponendo un loro uso nelle malattie demielinizzanti e da trauma del sistema nervoso (Fernandes et al, 2008). Nonostante queste premesse, uno studio condotto da Gorio e collaboratori, in cui sono state trapiantate in ratti sottoposti a contusione spinale delle cellule estratte dalla pelle di ratto che *in vitro* formavano delle sfere ed esprimevano nestina, come le SKP, ha mostrato che queste cellule migrano nel sito di lesione e sopravvivono a lungo esprimendo marcatori neurali e gliali, ma non inducono un recupero motorio migliore dei controlli (Gorio et al, 2004).

-Possibile utilizzo delle cellule del liquido amniotico:

Il liquido amniotico, che da recenti lavori sembra contenere cellule pluripotenti capaci di dare origine *in vitro* a cellule endodermiche, mesodermiche ed ectodermiche [7], sembra una fonte promettente di cellule staminali e/o progenitori cellulari. Le potenzialità terapeutiche del liquido amniotico sono per ora state studiate in modelli di infarto del miocardio (Chiavegato et al, 2007), di danno polmonare da iperossia (Carraro et al, 2008) e di ischemia cerebrale (Cipriani et al, 2007), mentre per quanto riguarda la lesione spinale sono state impiegate finora solo le cellule epiteliali amniotiche estratte della placenta di parti cesarei, che costituiscono probabilmente solo uno dei numerosi tipi cellulari contenuti nel liquido amniotico. Da questi studi (Wu et al, 2006; Sankarar and Muthusamy, 2003), sembra che le cellule epiteliali amniotiche si integrino nel tessuto dell'ospite ed inducano un recupero motorio negli animali trapiantati, ma questi risultati non sono stati confermati da ulteriori lavori.

Lo studio delle caratteristiche e delle potenzialità terapeutiche delle diverse popolazioni cellulari estratte dal liquido amniotico potrebbe quindi contribuire ad ampliare le conoscenze su questa fonte di staminali ancora poco studiata e le possibilità di cura per il trauma spinale.

1.4 LE CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO

Nell'uomo il sacco amniotico è formato da due membrane, una interna, l'amnios, che contiene il liquido amniotico e il feto, e una esterna, il corion, che aderisce all'amnios e fa parte della placenta. L'amnios è un annesso embrionale derivante dall'ectoderma e dal mesoderma che inizialmente è a contatto con l'embrione ma, dopo circa 4-5 settimane, a causa dell'accumulo del liquido amniotico, si espande sino ad aderire alla superficie interna del corion, e quindi alla cavità uterina (Fig.1.2).

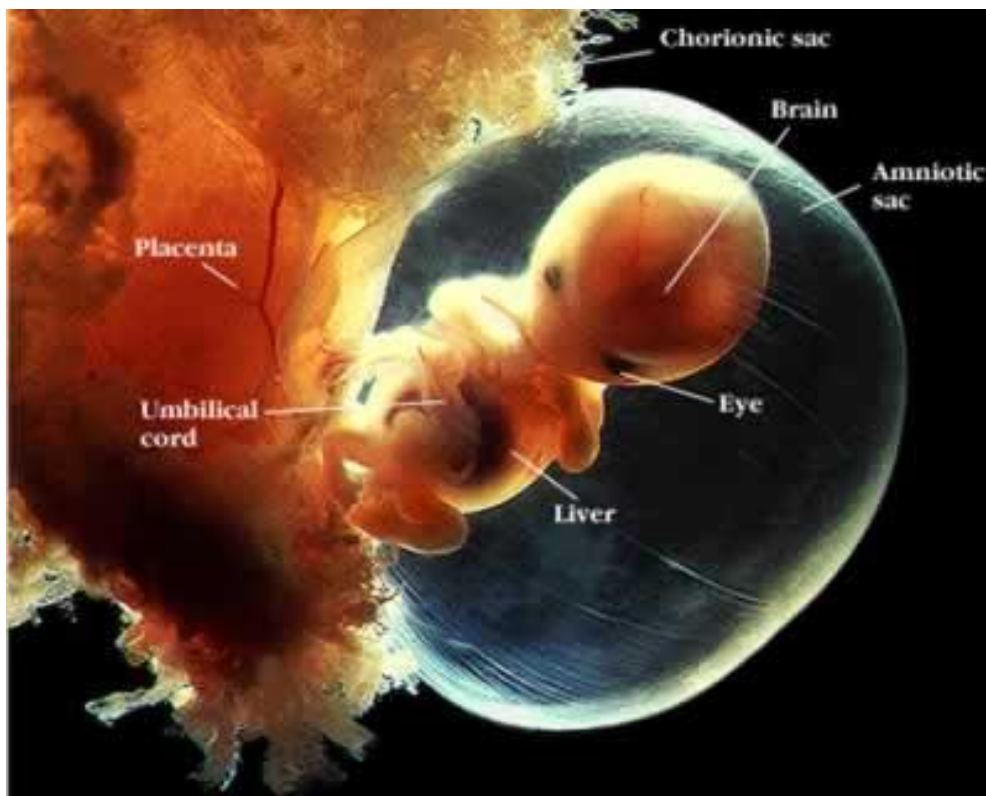


Fig.1.2: *Feto durante lo sviluppo, e in evidenza gli annessi embrionali*

La quantità di liquido amniotico aumenta fino al sesto-settimo mese di gravidanza, prima di diminuire lievemente; alla fine della gravidanza la quantità di liquido sarà pari

a circa 800 ml. Le cellule iniziano a comparire nel liquido amniotico verso la 14^a settimana gestazionale ed il loro numero continua ad aumentare durante tutta la gravidanza, anche se diminuisce la proporzione di cellule vive (Gosden CM, 1983).

Il liquido amniotico viene utilizzato di routine da molto tempo per lo screening prenatale di malattie genetiche e congenite fetali, ma solo da pochi anni viene considerato anche una possibile fonte di cellule indifferenziate potenzialmente utili per la terapia di alcune malattie umane.

Il liquido amniotico contiene infatti una popolazione cellulare estremamente eterogenea, formata da cellule derivate dal feto e dagli annessi fetali. Una classificazione risalente al 1983 ma ancora ampiamente accettata, basata su caratteristiche morfologiche, di crescita e biochimiche, divide queste cellule in tre tipi: amniotiche, epiteliodi e fibroblastiche. Secondo questa classificazione le cellule specifiche del liquido amniotico, derivate dal corion e dall'amnios, presentano un aspetto pleomorfo, hanno un tasso di crescita medio-alto, sono debolmente positive alla citocheratina 8-18 e sintetizzano la gonadotropina corionica. Le cellule di tipo fibroblastico, appartenenti al connettivo e al derma del feto, hanno una morfologia simile a quella dei fibroblasti, con una forma allungata, si dividono molto velocemente, sono negative alla citocheratina 8-18 e non producono la gonadotropina corionica. Infine le cellule di tipo epitelioide, desquamate dalla pelle e dal tratto urinario

e digestivo del feto, hanno una forma poligonale o tipo squama, spesso sono multinucleate, si dividono molto lentamente e sono positive alla citocheratina 8-18 (Gosden CM, 1983). La proporzione relativa fra i vari tipi cambia con l'età gestazionale, oltre che con l'eventuale presenza di patologie del feto.

Le cellule del liquido amniotico vengono generalmente isolate per la loro capacità di aderire al fondo di plastica o vetro delle petri, necessitano di un terreno di crescita relativamente semplice per proliferare e non necessitano della presenza di feeder layers (Phermthai et al, 2010). Vari terreni di crescita sono stati utilizzati nei vari lavori presenti in letteratura (Da Sacco et al, 2010; Steigman, 2007; Sikkema-Raddatz et al, 2003), dai quali emerge che le condizioni migliori per la crescita siano la presenza nel terreno di siero fetale, insieme a fattori di crescita quali bFGF (Basic Fibroblast Grow Factor) o l'utilizzo di terreni commerciali, tra cui i più usati risultano essere il Chang's Medium (Irvine Scientific) o Amniomax-II. Il tasso di crescita di tali cellule risulta superiore se esse vengono coltivate in 37°C e a bassa tensione di ossigeno (5%) (Sikkema-Raddatz et al, 2006) ed esse, in tali condizioni, presentano un altissima capacità proliferativa *in vitro*, fino a raggiungere le 250 duplicazioni cellulari, con un tempo di duplicazione medio di 1,6 giorni (De Coppi et al, 2007). Come descritto in un recente lavoro, tale tempo di duplicazione potrebbe diminuire, fino addirittura dimezzare (0,8 giorni) se venisse effettuata una selezione clonale all'interno della coltura primaria, e ciò permetterebbe di ottenere una popolazione "pura", con una capacità proliferativa da 2 a 5 volte maggiore della popolazione mista (Phermthai et al, 2010).

L'utilizzo *in vivo* delle cellule del liquido amniotico non ha inoltre finora mostrato la formazione di tumori (De Coppi et al, 2007; Zhang et al, 2010) e il loro utilizzo non comporta problematiche etiche, legate invece all' utilizzo di altri tipi di cellule (Prusa et al, 2003; Tsai et al, 2004; Holden C., 2007; Marcus A.J. et al, 2008).

Nel 2001 è stato pubblicato il primo lavoro che proponeva un utilizzo diverso delle cellule del liquido amniotico oltre alla diagnosi prenatale: gli autori avevano isolato cellule con un profilo immunocitochimico di tipo mesenchimale da liquidi amniotici di pecora e dopo l'espansione le avevano seminate in un polimero di acido poliglicolico, dimostrando che queste cellule colonizzavano lo scaffold e potevano quindi essere utilizzate per correggere difetti fetali attraverso l'ingegneria tissutale (Kaviani et al, 2001). Nel 2003 tale esperimento è stato ripetuto utilizzando cellule umane e ottenendo i medesimi risultati (Kaviani et al, 2003); infine nel 2007 questa metodica è stata impiegata da un altro gruppo per rivestire valvole cardiache da utilizzare come trapianto autologo dopo la nascita (Schmidt et al, 2007) e le loro potenzialità nel campo della rigenerazione del tessuto cardiaco sono state variamente studiate in recenti lavori (Walther G. et al, 2009; Yeh Y.C. et al, 2010).

Le patologie per le quali è stato tentato un approccio cellulare, che utilizza cellule del liquido amniotico, sono riportate nella tabella sottostante (Tab.1.4).

<i>Target Disease</i>	<i>References</i>
Prenatal Diagnosis	Cananzi et al., 2009
Peripheral nerve regeneration, Sciatic nerve regeneration following crush	Cheng et al., 2010
Myocardial infarction (cardiac and smooth muscles) and Ischemia	Chiavegato et al., 2007; Delo et al., 2010
Tumors and genetic disorders	De Coppi et al., 2007; Yen et al., 2005
Organ specific regeneration	Da Sacco et al., 2010
Tissue engineering, cell transplantation, and gene therapy	Fauza, 2004
Diabetes	In 't Anker et al., 2003
Mammary Gland Regeneration	Klemmt et al., 2010
Muscular Disease	Mauro et al., 2010
Parkinson's, Alzheimer's, heart disease, diabetes, stroke, spinal cord injuries, and burns	Prusa et al., 2002, Yang et al., 2009
Neurodegenerative diseases and nervous system injuries	Tsai et al., 2006

Tab.1.4: Patologie trattate mediante terapia cellulare, utilizzando cellule del liquido amniotico (Antonucci et al, 2010)

La prima evidenza che il liquido amniotico possa contenere cellule con caratteristiche di "staminalità" si è avuta nel 2003, quando Prusa e collaboratori dimostrarono che una sottopopolazione di cellule del liquido amniotico, che si dividevano più velocemente delle altre, esprimevano Oct-4, un fattore di

trascrizione delle cellule staminali (Prusa et al, 2003). Numerosi altri lavori hanno poi confermato la presenza di queste cellule positive a Oct-4 (Prusa et al, 2003; Tsai et al, 2004) e la presenza sulla loro superficie di marcatori mesenchimali quali CD90, CD105 e CD73, CD166, ma altri marcatori quali CD45, CD34 o CD14 risultavano assenti (Siegel N et al, 2007; Antonucci I et al, 2010).

Tali risultati sono stati più volte confermati da studi di RT-PCR, che hanno mostrato in tali cellule l'espressione di geni caratteristici di cellule indifferenziate.

In un recente lavoro sono stati confrontati liquidi amniotici provenienti da amniocentesi effettuate dalla 15^a alla 20^a settimana di gestazione, e le cellule così isolate mostravano l'espressione di marcatori di tipo ectodermico, endodermico e mesodermico. L'espressione di geni caratteristici dei foglietti endodermico e mesodermico diminuivano con l'aumentare delle settimane di gestazione, mentre i marcatori di tipo ectodermico risultavano sempre espressi ad alti livelli. In tutti i campioni, inoltre, si poteva osservare la consistente espressione di geni caratteristici di cellule staminali, quali CD90, Oct4 e CKit e, a diversi livelli, l'espressione di marcatori immaturi caratteristici di differenti tessuti quali quello cardiaco, polmonare, renale, tiroideo e altri (Da Sacco et al, 2010).

In molti lavori presenti in letteratura, inoltre, è stata descritta la capacità differenziativa delle cellule isolate verso le linee adipogenica, osteogenica, miogenica, epatica, neurogenica ed endoteliale (De Coppi et al 2007, Perin L et al, 2008).

La prima dimostrazione organica che, partendo da una singola cellula positiva a Ckit (CD117, il recettore per lo stem cell factor), si otteneva una popolazione clonale che contemporaneamente esprimeva Oct-4, aveva un alto tasso di

proliferazione ed era in grado di differenziare verso sei distinte linee (adipogenica, osteogenica, miogenica, endoteliale, neurogenica ed epatica), si è avuta in realtà nel 2007, con la pubblicazione del gruppo di Atala (De Coppi et al., 2007) (Fig.1.3).

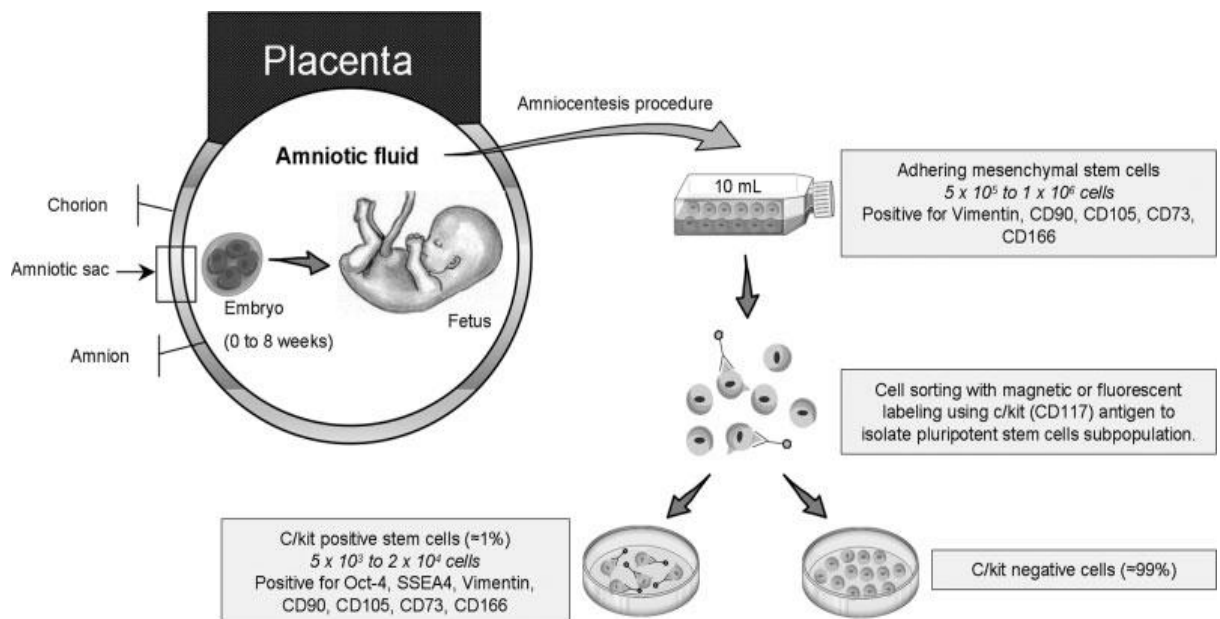


Fig.1.3: Dopo espansione, una sottopolazione di cellule pluripotenti è stata isolata mediante immunoselezione per il marcatore c/kit (CD117). La popolazione così selezionata risultava positiva per i marcatori embrionali Oct-4 e SSEA-4 e per i marcatori mesenchimali come Vimentina, CD90, CD105, CD73 e CD166 (Walther et al, 2009).

L'isolamento, l'espansione e il trapianto delle cellule provenienti da liquido amniotico ha suscitato grande interesse, per molteplici ragioni: la grande accessibilità della fonte, la loro dimostrata capacità differenziativa e l'assenza di tumorigenicità e di problematiche etiche legate al loro utilizzo. Il loro isolamento risulta inoltre piuttosto semplice ed esse presentano, in condizioni standard, un elevato tasso di proliferazione *in vitro*.

E' bene però sottolineare che gli studi finora descritti sono stati condotti su liquidi amniotici provenienti da scarti di amniocentesi, una metodica che presenta dei rischi per la salute del feto e della madre. Sarebbe dunque un notevole progresso poter utilizzare le cellule isolate da liquidi amniotici raccolti in modo meno invasivo, come nel caso di quelli provenienti da parti cesarei.

Inoltre, recentemente è stata scoperta una nuova tecnica che permette di analizzare il DNA del feto da cellule circolanti nel sangue materno, offrendo così la possibilità di un metodo di diagnosi prenatale non invasivo, evitando la necessità di utilizzare tecniche invasive quali amniocentesi o l'analisi dei villi coriali (Lun et al, 2008; Wright and Burton, 2009; Hall et al, 2010).

Attualmente, solo due lavori hanno studiato le cellule isolate da liquido amniotico prelevato da gravidanze a termine: nel primo, gli autori sono riusciti ad isolare le cellule aderenti in due campioni su dieci (In't Anker et al, 2004) mentre nel secondo, recentemente pubblicato, sono state isolate cellule che esprimevano le caratteristiche di staminali mesenchimali in quindici campioni su quarantotto (You et al, 2008). Questa bassa resa dei campioni prelevati al terzo trimestre rispetto a quelli del secondo trimestre è probabilmente dovuta al fatto che con il progredire della gravidanza diminuisce il numero di cellule vitali contenute all'interno del liquido amniotico (Gosden CM, 1983). Resta inoltre da stabilire se le cellule isolate da parti a termine abbiano le stesse potenzialità, in termini di capacità di differenziamento e di proliferazione, delle cellule prelevate nel secondo trimestre in seguito ad amniocentesi.

Data quindi la scarsità di studi riguardanti le cellule del liquido amniotico del terzo trimestre e l'utilità, come detto in precedenza, di vagliare un metodo di raccolta

dei campioni che presenti meno rischi per il nascituro e sia meno invasivo per la madre, abbiamo deciso di utilizzare nei nostri esperimenti le cellule di liquidi amniotici prelevati durante parti cesarei, cercando di mettere a punto una metodica di isolamento delle cellule che aumentasse la resa di cellule aderenti da ciascun campione.

2. MATERIALI E METODI

2.1 ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO

2.1.1 ISOLAMENTO E CULTURA PRIMARIA

I campioni di liquido amniotico (n=9) sono stati prelevati da parti cesarei programmati. L'età gestazionale media era di 39 (DS \pm 2) settimane. Una volta aperta la parete uterina per il taglio cesareo, è stata inserita una siringa da 20 mL attraverso le membrane ed è stato aspirato il liquido amniotico, in media 10,2 ml (DS \pm 3,8).

Ogni campione è stato trasferito in un tubo da 15 ml e centrifugato a 300 g per 10 minuti. Il sopranatante è stato scartato ed il pellet cellulare è stato risospeso nel terreno di crescita e seminato in petri da 35 mm contenenti otto vetrini coprioggetto. Per ogni petri è stato seminato l'equivalente di 3 ml di volume iniziale di liquido amniotico.

Le cellule sono state incubate a 37°C in CO₂ al 5% e bassa concentrazione di O₂ (5%). Dopo circa 7 giorni i vetrini coprioggetto presenti nelle petri sono stati prelevati e messi ciascuno in un pozzetto di una piastra da 48 pozzetti, in modo da isolare il tipo cellulare aderente prevalente su ciascun vetrino. Quando le cellule hanno raggiunto la confluenza sono state staccate dal vetrino mediante tripsinizzazione, raccolte, contate e riseminate ad una densità di 10.000 cellule/cm² in un pozzetto di dimensioni appropriate rispetto al numero totale di cellule. Ciascuna coltura è stata così propagata passando

le cellule quando arrivavano a circa l'80% di confluenza (ogni 4-7 giorni) (Fig.2.1).

Il terreno di crescita era composto da DMEM a bassa concentrazione di glucosio (1mg/ml, Euroclone) o α MEM (Gibco), 100U/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomicina (Euroclone) (pen/strep), 5 ng/ml di bFGF (basic fibroblast growth factor) (Peprotech EC), L-glutamina (Euroclone) 2 mM e FBS (fetal bovine serum) (Euroclone) al 10%. Per staccare le cellule è stata utilizzato TrypLE Express (Gibco).

A ciascun passaggio la conta delle cellule è stata effettuata in una camera di Burker utilizzando Trypan Blue (Sigma) per escludere le cellule morte.

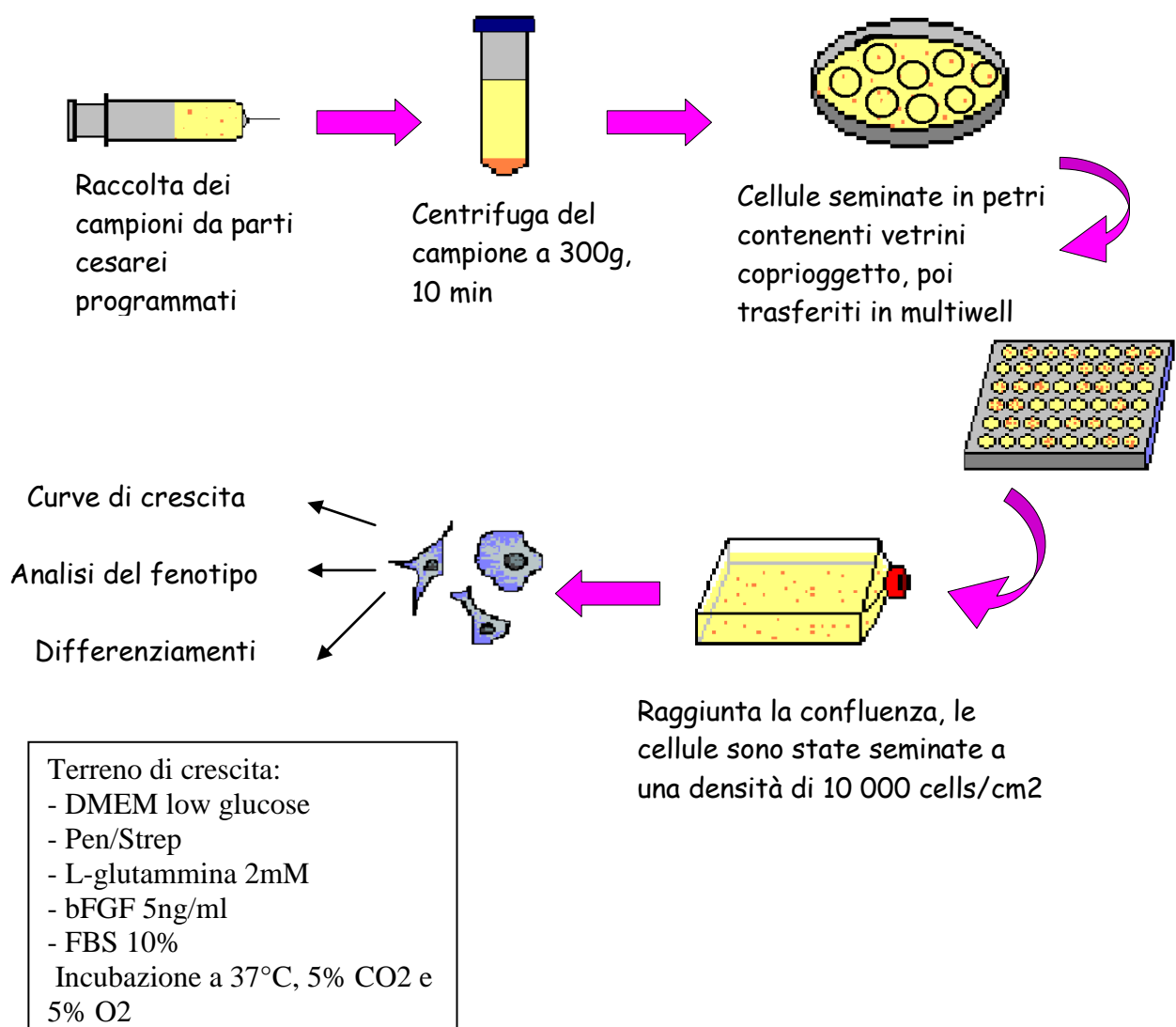


Fig.2.1: *Schema riassuntivo illustrante la procedura di isolamento delle cellule contenute nel liquido amniotico.*

2.1.2 FIBROBLASTI

Fibroblasti umani derivati dalla pelle di neonato sono stati usati come controllo negativo nei saggi sulla capacità differenziativa. I fibroblasti sono stati coltivati in DMEM a bassa concentrazione di glucosio (1mg/ml), addizionato con pen/strep (100mg/ml), L-glutamina 2mM e FBS al 10%.

Test per il mycoplasma

Allo scopo di escludere la presenza del Mycoplasma nelle colture cellulari è stata effettuata regolarmente una PCR utilizzando come campione pochi microlitri di terreno prelevati dalla coltura e bolliti per 10 minuti. La sequenza dei primer utilizzati per rivelare la presenza del microrganismo era:

FWD – 5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA 3'

REV – 5' TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCT 3'.

La miscela di reazione, di 25 µl totali, conteneva 2 µl di campione bollito, 10 mM per ciascun nucleotide della dNTP mix (Euroclone), buffer 10 X (Qiagen), 10 µM di ciascun primer (Invitrogen) e 5 U/µl di Taq (Qiagen).

La PCR è stata eseguita con un termociclatore MJ Opticon 2 e prevedeva un minuto di denaturazione a 94 °C seguito da 40 cicli (consistente ciascuno in 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 56 °C e 45 secondi a 72 °C) ed infine da 10 minuti a 72 °C.

Dopo l'amplificazione, 10 µl di ciascun prodotto di reazione sono stati uniti a 2 µl di blue/orange loading dye 6X (Promega), caricati in un gel di agarosio (Euroclone) al 2% contenente 0.5 µg/ml di etidio bromuro (Sigma) e separati

mediante elettroforesi. Il gel è stato poi fotografato sotto una luce UV mediante un sistema digitale di acquisizione delle immagini Kodak (Gel Logic 1500 Imaging System).

Il test è stato effettuato ogni 3 passaggi sul terreno di coltura delle cellule oppure ogni volta che le cellule venivano congelate o scongelate; ad oggi non è stata trovata alcuna coltura infetta.

2.1.3 VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DEL CROMOSOMA Y

Per accertare l'origine fetale e non materna delle cellule isolate, nei campioni provenienti da parti in cui il neonato era maschio è stata saggiata la presenza del cromosoma Y mediante PCR convenzionale sul DNA estratto dalle colture cellulari.

Brevemente, $1-2 \times 10^6$ cellule per ciascuna coltura sono state trattate con 1 mg di proteinasi K overnight a 55 °C. Il DNA è stato poi estratto con fenolo-cloroformio, precipitato con isopropanolo, lavato con etanolo al 70 % ed infine risospeso in acqua distillata.

Sono stati utilizzati i seguenti primer per amplificare una sequenza specifica del cromosoma Y:

FWD – 5' CAGTGTGAAACGGGAGAAAACAGT 3'

REV – 5' CTTCCGACGAGGTCGATACTTATA 3'

La PCR e l'elettroforesi su gel sono state effettuate con le stesse modalità del test del Mycoplasma, ma facendo 30 cicli di amplificazione.

Sono stati usati come controllo negativo e positivo della PCR rispettivamente del DNA proveniente da donatori umani, sia maschi che femmine.

2.1.4 ESTRAZIONE DI RNA

Le cellule sono state prelevate dalla superficie della fiasca tramite tripsinizzazione, lavate con PBS e poste in Trizol (Invitrogen). Esse sono state poi congelate a -80 °C fino al momento della preparazione.

Per la procedura di estrazione, le cellule sono state scongelate e lisate nel Trizol (per 5 min a temperatura ambiente) e la separazione in fase acquosa ed organica è stata ottenuta mediante l'aggiunta di cloroformio e successiva centrifugazione per 15 minuti a 12.000 rpm (13.500 g) a 4°C. La fase acquosa contenente l'RNA è stata successivamente spostata in un nuova eppendorf e l'RNA è stato precipitato addizionando alcool isopropilico in rapporto di 500 µl per ml di Trizol iniziale, centrifugando a 12.000 rpm (13.500 g) per 5 min. Il pellet di RNA così ottenuto è stato lavato in etanolo 75%, centrifugato a 7.500 rpm (5.250 g) per 5 minuti a 4° e quindi asciugato all'aria. Una volta asciutto l'RNA è stato risospeso in acqua trattata con dietil policarbonato (DEPC), un inibitore delle RNasi .

L'RNA estratto è stato quindi trattato con DNAsi (New England Biolabs): 43,5 µl di ogni campione sono stati posti in un tubo da PCR con 5 µl 10X DNase soluzione di reazione, 1 µl DNAsi e 0,5 µl di inibitore delle RNAsi. La soluzione è stata quindi mantenuta per 1 ora a 37 °C, quindi l'enzima è stato inattivato a 95°C per 5 minuti. Al termine del trattamento l'RNA è stato estratto con PCI (Fenolo (Merck) 50%; Cloroformio (Merck) 48%; Alcool Isoamilico (Sigma) 2%), purificato dal fenolo mediante trattamento con cloroformio, precipitato ed il pellet lavato in EtOH 75% e risospeso in H₂O. L'RNA è stato conservato a -80°C.

2.1.5 RETROTRASCRIZIONE

L'RNA trattato con DNAsi ottenuto è stato diviso in due aliquote. Il 50% del prodotto ottenuto è stato retrotrascritto in cDNA; l'aliquota rimanente è stata immagazzinata a -80°C per ulteriori studi. La Retrotrascrizione è stata effettuata con il kit iScript (Bio-Rad).

La soluzione di reazione era così costituita:

- RNA trattato con DNAsi 15 μl
- Retrotrascrittasi 1 μl
- Buffer di reazione (5x) 4 μl

Le condizioni di reazione effettuate sono:

- 25° 5 minuti
- 42° 30 minuti
- 85° 5 minuti

Come controllo per escludere la presenza di DNA genomico è stata effettuata una reazione con la stessa quantità di RNA, ma in assenza di enzima (mock).

2.1.6 REAL TIME PCR E ANALISI DEI DATI

I cDNA ottenuti da ogni campione cellulare sono stati testati mediante Real Time PCR (Bio-Rad iQ Sybr-Green) per l'espressione di Nestina, GFAP, β -Tubulina III, neurofilamenti, NGF, OCT-4 e Musashi.

I campioni cellulari sottoposti a stimolo adipogenico sono stati testati per PPAR 2 e PPAR- γ -C1 α , impiegando come controllo cellule mantenute in condizioni analoghe per la stessa durata del differenziamento, ma nel solo terreno di crescita. I campioni sottoposti a stimolo osteogenico, invece, sono stati testati

per RunX2 e Osteocalcina, con controlli analoghi a quelli impiegati per l'adipogenesi.

Come gene housekeeping è stato impiegato RNA ribosomiale 18S (Ambion kit QuantumRNATM 18S Internal Standard).

La Real Time PCR è stata eseguita con un termociclatore MJ Opticon 2, utilizzando il seguente protocollo:

- 10 minuti a 95 °C
- 40 cicli (30 secondi a 95°C, 1 minuto a 56°C, 1 minuto a 72°C, plate reading)
- curva di melting da 55° a 95° con lettura ogni 0,5 °C

La soluzione di reazione è stata realizzata con Sybr-Green mix 2x Bio-Rad 7,5 µl, cDNA 4 µl, primer Forward e Reverse (5 µM per il gene di interesse, 3 µM per il gene housekeeping) 1 µl ciascuno, H₂O 1,5 µl per pozzetto. Il volume di reazione finale è di 15 µl. Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio.

I dati risultanti per ogni gene di interesse sono stati analizzati col metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e cioè:

- ogni dato ottenuto è stato normalizzato sottraendo il valore del corrispondente housekeeping gene. La differenza tra il valore di un campione per il gene di interesse ed il valore dello stesso campione per il gene di riferimento è il $\Delta C(t)$. Tanto più alto risulta questo valore tanto poco abbondante è il gene di interesse.
- i $\Delta C(t)$ così ottenuti sono stati normalizzati ponendo come valore 0 il campione che ha dato il prodotto minore ($\Delta C(t)$ più elevato). La differenza tra il $\Delta C(t)$ di ogni campione ed il $\Delta C(t)$ maggiore tra tutti i campioni è il $\Delta\Delta C(t)$

- elevando 2 a $(-\Delta\Delta C(t))$ si ottiene una stima del prodotto di ogni campione rispetto al valore del campione che ha dato la minore quantità di prodotto, utilizzato come valore 1.

E' stato inoltre comparato il dato di campioni a passaggi diversi per verificare le eventuali alterazioni dell'espressione genica nel tempo. I dati sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'analisi citofluorimetrica.

2.1.7 SAGGIO DELLA CAPACITA' PROLIFERATIVA

E' stata effettuata un'analisi della proliferazione mediante curve di crescita di tutte le colture studiate, iniziando generalmente dal passaggio 2 o 3. Le cellule sono state seminate ad una densità di 10.000 cellule/cm² in fiasche da 25 cm² (250.000 cellule per fiasca) con 5 ml di terreno di coltura, passate quando arrivavano a circa l'80% della confluenza e riseminate alla stessa densità. Questa procedura è stata ripetuta per circa un mese (6-8 passaggi). Il numero totale di cellule stimato ad ogni passaggio è stato calcolato moltiplicando il tasso di amplificazione (numero totale di cellule ottenuto in quel passaggio/250.000) per il numero totale di cellule ottenuto al passaggio precedente.

A ciascun passaggio la conta delle cellule è stata effettuata in una camera di Burker utilizzando il Trypan Blue (Sigma) per escludere le cellule morte o morenti.

2.1.8 SAGGIO DELLA CAPACITA' DIFFERENZIAATIVA

E' stata testata la capacità di alcune delle popolazioni cellulari isolate di dare origine a cellule mesodermiche (adipociti e osteociti) ed ectodermiche (neuroni).

- **Adipogenesi.** Le cellule di sette delle colture isolate sono state seminate in pozzetti di una 48-multiwell e, una volta raggiunta la confluenza del 100%, il terreno di crescita è stato sostituito con terreno adipogenico, così costituito: DMEM a bassa concentrazione di glucosio (1mg/ml) (Euroclone), penicillina 100U/ml/streptomicina 100 mg/ml (Euroclone), FBS al 10% (Euroclone), 1 μ M di desametasone (Sigma), 0,5 mM di IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) (Sigma), 10 μ g/ml di insulina (Sigma) e 100 μ M di indometacina (Fluka). Tale terreno adipogenico è stato sostituito completamente ogni 2-3 giorni. Dopo 2 settimane circa, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% (Sigma) e fatte reagire con una soluzione allo 0.36% di Oil Red O (Sigma) in isopropanolo al 60% per rivelare la presenza di gocce lipidiche. I nuclei sono stati colorati con ematossilina (Fluka).

Sono stati sottoposti a stimolo adipogenico con le stesse modalità sopradescritte anche i fibroblasti umani, usati come controllo negativo.

- **Osteogenesi.** Le cellule di sette delle colture isolate sono state analogamente seminate in pozzetti di una 48-multiwell con 500 μ l di terreno di crescita e, una volta raggiunta una confluenza del 100%, il terreno di crescita è stato sostituito con terreno osteogenico così composto: DMEM a bassa concentrazione di glucosio (Sigma), penicillina 100U/ml/streptomicina 100 mg/ml (Euroclone), 10% FBS (Euroclone), desametasone 1 μ M (Sigma), acido ascorbico 200 μ M (Sigma), Glicerolo 2-fosfato 10 mM (CALBIOCHEM), L-glutamina 2mM (Euroclone). Il terreno osteogenico è stato sostituito completamente ogni 2-3 giorni.

Dopo 14-17 giorni le cellule sono state fissate, mettendole a incubare in etanolo al 70% freddo per 1 ora, a temperatura ambiente. Dopo aver effettuato 2 lavaggi in acqua distillata, le cellule sono state poi poste ad incubare in Alizarin Red (SIGMA), per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente i vetrini sono stati lavati con acqua distillata e montati in glicerolo al 50%.

- **Neurogenesi.** Per effettuare tale differenziamento stati utilizzati tre metodi diversi, presenti in letteratura. Per ogni metododica utilizzata, le cellule delle quattro colture analizzate sono state seminate ad una densità di 3.000 e 30.000 cellule/cm² in pozzetti di una 48-multiwell contenenti un vetrino coprioggetto.

Nel primo metodo, tratto da Delo et al del 2006, le cellule sono state seminate in un medium contenente DMEM a bassa concentrazione di glucosio, DMSO al 2% (Sigma), 0.2 mM di butylated hydroxyanisole (Sigma) e 25 ng/ml di NGF (nerve growth factor) (Sigma), e dopo due giorni il medium è stato sostituito con il terreno di crescita senza bFGF ma con NGF. Nel secondo metodo, tratto da De Coppi et al. 2007, le cellule sono state seminate su vetrini trattati con fibronectina (Sigma) ed in presenza di un medium neuralizzante composto da DMEM/F12 (Gibco), N2 supplement (Millipore) e 10 ng/ml di bFGF. Infine nel terzo metodo, tratto da Kim et al, 2007, le cellule sono state messe overnight in un medium contenente DMEM bassa concentrazione di glucosio, FBS al 20%, 20 ng/ml di bFGF e 20 ng/ml di EGF (epidermal growth factor) (Peprotech EC), ed il giorno dopo in un terreno costituito da DMEM/F12, DMSO al 2%, 0.2 mM di butylated hydroxyanisole, 25 mM di KCl (Sigma), 2

mM di acido valproico (Sigma), 1 μ M di idrocortisone (Sigma) e supplemento N2. Per tutti e tre i metodi i terreni sono stati cambiati ogni due giorni. Dopo circa 7 giorni le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% ed analizzate mediante immunocitochimica per la presenza di β tubulina III e GFAP. Sono stati sottoposti a stimolo neurogenico con le stesse modalità sopradescritte anche i fibroblasti umani, usati come controllo negativo.

2.1.9 ANALISI IMMUNOCITOCHIMICA

Cellule provenienti da ciascuna cultura sono state seminate su vetrini coprioggetto circolari posti in multipiastra da 48 pozzetti e dopo 2-3 giorni sono state fissate in paraformaldeide al 4%. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti condroitin solfato proteoglicano (NG2) (AB5320, Chemicon, 1:100), anti-nestina (MAB1259, R&D 1:100), anti-citocheratina 8-18 (MS743-S0, Lab Vision, 1:100), anti-vimentina (SC 7557, Santa Cruz, 1:100), anti-musashi-1 (AB5977, Chemicon, 1:1000), anti-proteina associata ai microtubuli (MAP2) (AB5622, Chemicon, 1:500), anti-neurofilamento H (AB5539, Chemicon 1:250), Oct 3/4 (AF1759, R&D, 1:100).

Come anticorpi secondari sono stati impiegati gli ALEXA 488, 555 e 546 (Invitrogen, tutti 1:1000). I nuclei sono stati marcati con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Sono stati effettuati anche dei controlli negativi per escludere l'autoimmunofluorescenza nei quali è stato omissa l'anticorpo primario.

I vetrini sono stati osservati e fotografati sia mediante microscopio a fluorescenza (Leica) che microscopio confocale (Leica SP2, con lasers He/Kr e Ar, Heidelberg, Germany).

2.1.10 ANALISI CITOFUORIMETRICA

Le cellule delle colture 1#1 (passaggi 5 e 7), 3#5 (passaggio 3), 3#35 (passaggio 6) e 3#6 (passaggi 4 e 6) sono state caratterizzate per la presenza di marcatori di superficie ed intracellulari mediante FACS (Fluorescence-activated cell sorting) con anticorpi monoclonali per antigeni di istocompatibilità (HLA-ABC e HLA-DR), marcatori di differenziamento endoteliale (CD31, CD144 e CD133), marcatori di differenziamento ematopoietico (CD45 e CD34), marcatori di differenziamento epiteliale (citocheratine 5,6,8,17,18,19, MUC-1 ed E-caderina), marcatori di differenziamento mesenchimale-perivascolare (CD146, CD90, CD73 e CD105), marcatori di differenziamento muscolo-neurale (CD56, NG2 e NGFR), marcatori embrionali (SSEA-4) e marcatori di staminalità (CD117). Le cellule tripsinizzate e contate sono state lavate in PBS e siero al 2% ed incubate a 4°C per 10 minuti con anticorpi primari coniugati ad un fluoroforo o con anticorpo primario non coniugato e anticorpo secondario coniugato a fluoroforo. I fluorofori usati sono APC, PE, FITC, PB, Cy7, PC5 e PC7. Come controllo sono stati usati i rispettivi isotipi.

I campioni sono stati acquisiti utilizzando un FACScanto (BD) ed i dati sono stati analizzati dal software Flow Jo (Treestar).

I pannelli di marcatori impiegati sono i seguenti:

Pannello per cellule staminali ematopoietiche: CD45, CD34.

Pannello per cellule endoteliali: CD144, CD31, CD133.

Pannello epiteliale: Caderina, MUC1, PAN CK/Citocheratina 8-18.

Pannello per cellule staminali embrionali: SSEA4.

Pannello di staminalità: CD117.

Pannello per cellule mesenchimali/perivascolari: CD105, CD90, CD73, CD146.

Pannello muscolo-neurale: NGFR, NG2, CD56.

Antigeni MHC: HLA-ABC, HLA-DR.

2.1.11 MISURAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI

Per le colture 1#1, 3#5, 7#42, 7#5, 9#p, 6#2 è stata effettuata la misurazione della lunghezza dei telomeri, sia a passaggi precoci che dopo un certo numero di passaggi in coltura.

Per fare ciò, il DNA genomico delle singole colture è stato isolato con Trizol (Invitrogen) secondo le procedure standard, e 1,5 ug di DNA sono stati digeriti, mediante gli enzimi HinfI e RsaI (rapporto 1:1). La reazione è stata effettuata in un volume di 30 ul, a 37°C, per 4h.

I prodotti di digestione sono stati controllati su gel di agarosio.

Per effettuare il blotting, i campioni sono stati poi caricati su gel di agarosio allo 0,8% in TAE buffer 1X (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA, pH 8.0) e corsi in TAE buffer a 5V/cm.

Per effettuare il Southern blotting, il gel è stato immerso in una soluzione di HCl 0,25M e agitato per 15-20 min a T ambiente finchè il bromofenolo incominciava a virare verso il colore giallo. Il gel è stato così sciacquato due volte con acqua distillata, immerso in una soluzione denaturante (0,5M NaOH, 1,5M NaCl) 2 volte, a T ambiente, per 15 min, e successivamente, immerso in una soluzione neutralizzante (0,5 M Tris-HCl, 3M NaCl, pH 7,5) 2 volte, per 15 minuti.

Il DNA è quindi stato trasferito per capillarità dal gel su una membrana di nylon, O/N, in buffer di trasferimento (3M NaCl, 0,3M Sodio citrato, pH 7.0) e, successivamente, è stato fissato sulla membrana tramite esposizione ai raggi UV (120 mJ). La membrana è stata poi lavata 2 volte con il buffer di trasferimento utilizzato in precedenza, diluito 1:10.

Per l'ibridizzazione, la membrana è stata immersa in una soluzione di ibridizzazione (Roche) preriscaldata a 42°C e messa ad incubare per 1 h, alla stessa temperatura. 1,3 µl di di probe di ibridizzazione sono stati aggiunti a 6,5 ml di soluzione di ibridizzazione, preincubata a 42°C, e quest'ultima è stata così aggiunta alla membrana (3h, a 42°C). La membrana è stata poi lavata due volte, in stringent wash buffer I (buffer di trasferimento dil 1:10, 0,1% SDS) e successivamente in stringent wash buffer II (buffer di trasferimento dil 1:100, 0,1% SDS) (2 lavaggi da 20 min, 50°C).

La membrana così preparata è stata poi sciacquata in washing buffer (Roche), incubata in blocking solution (Roche) 30 min a T ambiente, successivamente lavata ed incubata con Anti DIG-AP working solution (Roche) 30 min.

Infine, essa è stata lavata e incubata in detection buffer (Roche) e, successivamente, incubata in presenza del substrato per 5 min. Al termine dell'incubazione, il risultato è stato osservato dopo esposizione ai raggi X per 20 min.

2.1.12 ANALISI DEL CARIOTIPO

Per individuare le eventuali alterazioni cromosomiche eventualmente verificatesi nel corso dei cicli di replicativi e per confermare, nelle colture

derivate da feti maschi, l'origine fetale delle cellule isolate, è stata effettuata l'analisi del cariotipo, a bassi e ad alti passaggi.

Le cellule, una volta raggiunto l'80% di confluenza, sono state trattate con Colcemid (0,02 µg/ml) per 90 min e poi raccolte. Per ciascuna coltura sono stati analizzati 25 campioni in metafase e le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza (BX 60 Olympus) e analizzate mediante Powergene PS. Per generare anche colture derivate da cellule singole, cellule derivate da sei colture sono state diluite serialmente fino a raggiungere una concentrazione di 5 cell/ml, e 200 µl sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti, al fine di ottenere una concentrazione di 1 cell/pozzetto. Dopo poche ore, dopo che le cellule avevano aderito al fondo del pozzetto, sono stati selezionati i pozzetti contenenti cellule singole ed essi sono stati monitorati finchè da essi non si originasse un clone. Dopo la comparsa dei cloni, le cellule, raggiunta una confluenza dell'80%, sono state tripsinizzate ed espanse in piastre di dimensioni sempre crescenti (48MW, 24MW, etc.).

2.2 TRAPIANTO DELLE CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO

IN VIVO

2.2.1 ANIMALI E GRUPPI SPERIMENTALI

Sono stati usati per questo studio topi maschi CD1, dal peso compreso tra i 25 e 30 g, stabulati in condizioni standard (22 ± 2°C, 65% di umidità e luce artificiale fornita dalle 08.00 alle 20.00).

L'utilizzo degli animali è stato effettuato in conformità con le indicazioni del Comitato Etico dell'Ospedale S. Paolo e dell'Università di Milano e in accordo

con le linee guida per l'utilizzo degli animali da laboratorio fornite dalle Direttive della Comunità Europea del Novembre 1986 (86/609/EEC).

Gli animali sono stati divisi in gruppi di 15 animali ciascuno: nel primo gruppo gli animali sono stati lesionati e trapiantati con le cellule della coltura 1#1; nel secondo gruppo gli animali sono stati lesionati e trattati con cellule della coltura 3#6; nel terzo gruppo, gli animali sono stati lesionati e trattati con cellule della coltura 3#5; nel quarto gruppo gli animali sono stati lesionati e trattati con cellule della coltura 9#1. Infine, in un gruppo di controllo, gli animali sono stati lesionati ed trapiantati solo con solo D-PBS.

2.2.2 LESIONE SPINALE E CURE POST-OPERATORIE

Gli animali sono stati sottoposti ad una contusione moderata del midollo spinale. In breve, gli animali sono stati anestetizzati con idrato di cloralio al 4% (Sigma) e sottoposti ad una laminectomia a livello dell'ottava vertebra toracica. La superficie dorsale del midollo spinale è stata esposta ed è stata indotta la lesione usando una forza di 50 kdyne per un secondo con un pistone del diametro di 1 mm utilizzando un dispositivo della Precision and Instrumentation chiamato Infinite Device con il quale è possibile monitorare la forza e lo spostamento del pistone.

Dopo l'operazione, gli animali hanno ricevuto giornalmente per una settimana antibiotici (penicillina 100U/ml/streptomicina 100mg/ml), per via sottocutanea in prossimità della ferita e 2 ml di soluzione fisiologica sempre per via sottocutanea. La vescica è stata svuotata giornalmente finché non si è ristabilito il riflesso vescicale.

2.2.3 IMMUNOSOPPRESSIONE

La ciclosporina A (Biochemika) è stata dissolta in olio di semi alla concentrazione di 8 mg/ml e somministrata per via intraperitoneale alla dose giornaliera di 50 mg/kg/die dal giorno prima del trapianto per una settimana, per poi essere dimezzata a 25 mg/kg/die ed infine ridotta a 10 mg/kg/die dall'undicesimo giorno dal trapianto fino al sacrificio dell'animale.

2.2.4 MARCATURA DELLE CELLULE E TRAPIANTO

Per minimizzare la distruzione delle cellule dovuta allo stato infiammatorio, il trapianto (o l'iniezione di D-PBS nei controlli) è stato effettuato sette giorni dopo la lesione.

Le cellule sono state marcate con Qtracker 655 Cell Labeling Kit (Invitrogen) seguendo le istruzioni del produttore. Con questa nuova metodica, particolarmente indicata negli studi di trapianto cellulare *in vivo* a lungo termine, uno speciale peptide fornito nel kit rilascia i nanocristalli fluorescenti in rosso Qdot 655 nel citoplasma delle cellule vive: una volta fagocitati dalle cellule, questi danno una marcatura fluorescente intensa e stabile che può essere visualizzata anche dopo alcune divisioni cellulari e che non può essere trasferita alle cellule adiacenti (Jackson et al., 2007; Pinaud et al. 2005).

Dopo la marcatura le cellule sono state lavate nel terreno di crescita e poi in D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X, GIBCO), risospese in D-PBS ad una concentrazione di 10.000 cellule/ μ l ed iniettate nella vena della coda in due somministrazioni, distanziate di un'ora, per un totale di 1×10^6 cellule per animale.

2.2.5 TEST COMPORTAMENTALI

Allo scopo di valutare il grado di lesione ricevuta ed il successivo recupero motorio, è stata effettuata l'analisi comportamentale degli animali usando il punteggio della Basso Mouse Scale (BMS) nei giorni -1, 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35 dopo la lesione. La BMS è una scala di valutazione del recupero motorio per i topi con lesione spinale, che va da un massimo di 9 (topo sano) ad un minimo di 0 (caviglie posteriori del topo completamente immobili) (Tab.2.1). Durante il test ogni animale è stato valutato in campo aperto per 4 minuti in doppio cieco da due operatori, che hanno assegnato un punteggio ad ogni zampa posteriore e fatto poi la media tra le due zampe.

PUNTEGGIO	MOVIMENTO OSSERVATO NELL'ANIMALE
0	Nessun movimento della caviglia
1	Piccolo movimento della caviglia (angolo $\leq 90^\circ$)
2	Esteso movimento della caviglia (angolo $\geq 90^\circ$)
3	Posizionamento plantare della zampa posteriore con o senza supporto del peso oppure passo dorsale
4	Occasionale passo plantare (numero di passi plantari $\leq 50\%$ del tempo totale di movimento)
5	Frequente (numero di passi plantari $\geq 50\%$ del tempo totale di movimento) o consistente (meno di 5 passi persi in tutto il tempo di movimento) passo plantare senza coordinazione oppure frequente o consistente passo plantare con poca coordinazione (la maggior parte dei passi valutabili non sono coordinati) e zampe ruotate sia al contatto che al distacco
6	Frequente o consistente passo plantare con poca coordinazione e

	zampe parallele al contatto oppure frequente o consistente passo plantare con coordinazione prevalente (la maggior parte dei passi valutabili sono coordinati) e zampe ruotate sia al contatto che al distacco
7	Frequente o consistente passo plantare con coordinazione prevalente e zampe parallele al contatto ma non al distacco oppure frequente o consistente passo plantare con coordinazione prevalente, zampe parallele al contatto ma non al distacco e severa instabilità del tronco
8	Frequente o consistente passo plantare con coordinazione prevalente, zampe parallele sia al contatto che al distacco e leggera instabilità del tronco oppure frequente o consistente passo plantare con coordinazione prevalente, zampe parallele sia al contatto che al distacco, tronco stabile e coda su e giù
9	Frequente o consistente passo plantare con coordinazione prevalente, zampe parallele sia al contatto che al distacco, tronco stabile e coda sempre su

Tab. 2.1: *Schema riassuntivo del punteggio della Basso Mouse Scale*

2.2.6 IMMUNOISTOCIMICA

Gli animali sono stati sacrificati a quattro settimane dal trapianto, cioè a cinque settimane dalla lesione. Gli animali sono stati anestetizzati con una dose letale di anestetico (idrato di cloralio al 4%) e perfusi (per via intracardiaca) con paraformaldeide al 4%.

I midolli sono stati estratti e mantenuti overnight in paraformaldeide al 4%, successivamente sono stati lavati per 4 ore in soluzione salina, e quindi mantenuti per altre 3 ore in saccarosio (Sigma) al 15%. Infine i midolli sono stati mantenuti overnight in una soluzione di saccarosio al 30%. I midolli sono

stati poi inclusi nel mezzo di inclusione per criostato (Bio Optica) e congelati mediante ghiaccio secco. Successivamente i tessuti sono stati tagliati al criostato in sezioni di 10 μm e tenuti a -30°C .

Per l'immunofluorescenza le sezioni sono state lavate in PBS e poi con NH_4Cl , trattate con una soluzione bloccante i siti aspecifici contenente NGS (normal goat serum) e BSA (bovine serum albumin) ed incubate con l'anticorpo primario overnight a 4°C .

Sono stati usati i seguenti anticorpi primari: l'anti-macrofagi-monociti (MAB1852, Chemicon, 1:25), per valutare la risposta immunitaria dell'ospite, l'anti- β tubulina III (TUJ1, PRB-4357, 1:200 Covance, o MAB1637 Chemicon 1:200), marcatore dei neuroni, anti proteina fibrillare acida della glia (GFAP) (MMS-435P, Covance, 1:500), marcatore degli astrociti, e anti-nestina (MAB1259, R&D 1:100).

Dopo il trattamento con l'anticorpo primario, le sezioni sono state lavate con PBS e incubate con l'anticorpo secondario coniugato ad un fluoroforo (secondario coniugato a rodamina goat anti-rat 1:100, Alexa 555 donkey anti-mouse, o Alexa 546 goat anti-rabbit 1:200, o Alexa 488 donkey anti-mouse e goat anti-rabbit 1:200) per 45 minuti a temperatura ambiente, in PBS con 10% NGS. I nuclei sono stati poi successivamente colorati con 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) (Sigma) e le sezioni montate con FluorSave Reagent (Calbiochem).

Sono stati effettuati anche controlli negativi, nei quali è stato omesso l'anticorpo primario.

Le sezioni sono state osservate e fotografate sia mediante microscopio a fluorescenza (Leica) che microscopio confocale (Leica).

2.2.7 VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI CELLULE POSITIVE AL Q-DOT E CONTA NELL'AREA DI LESIONE

Le cellule sono state considerate positive alla marcatura con Qdot 655 quando risultavano intensamente fluorescenti al microscopio confocale e gli spot avevano un'emissione di 655 nm. Come referenza negativa per l'analisi confocale sono state usate sezioni di midollo da animali lesionati ed iniettati solo con D-PBS.

Per quantificare le cellule arrivate nel sito di lesione e sopravvissute per 4 settimane è stato valutato il numero di cellule positive al Qdot nelle sezioni trasversali di midollo degli animali trapiantati prendendo in considerazione un'area di 8 mm situata intorno alla lesione. Per far questo è stata fatta una media delle cellule positive al Qdot presenti in un gruppo di 3 sezioni consecutive spesse 10 µm e poi è stata ripetuta questa conta ogni 800 µm.

Misurazione della mielina nell'area di lesione

Le sezioni trasversali di midollo degli animali trapiantati e dei controlli (solo PBS) sacrificati a 1 e 4 settimane dal trapianto (o a 2 e 5 settimane dalla lesione nel caso dei controlli) sono state analizzate per la preservazione della mielina.

Brevemente, le sezioni sono state lavate in PBS e poi con NH₄Cl ed incubate con FluoroMyelin (Invitrogen, 1:300) per 30 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state quindi lavate in PBS, trattate con DAPI e montate usando

il FluorSave Reagent. Sono stati effettuati anche i controlli negativi omettendo l'incubazione con FluoroMyelin. E' stata infine fatta la comparazione dei livelli di mielina presente nella sostanza bianca della zona ventrale del midollo tra topi trapiantati e topi di controllo. L'analisi al microscopio confocale è stata effettuata usando gli stessi parametri di acquisizione delle immagini per i midolli di entrambi i gruppi (trattati e non trattati con cellule). Come controllo negativo sono state usate sezioni contigue a quelle analizzate non trattate con FluoroMyelin.

2.2.8 LECTINA

Per confrontare i livelli di vascolarizzazione nei tessuti degli animali trapiantati con le cellule e in quelli degli animali trattati con solo veicolo, sulle sezioni è stata effettuata colorazione con lectina, un colorante che si lega al glicocalice dell'endotelio vasale (Texas Red labeled tomato lectin, Vector laboratories, 1:50). Le sezioni sono state lavate con PBS 1X, e successivamente con NH_4Cl per 30 min; sono state poi incubate con lectina, al buio, per 2h a temperatura ambiente. Le sezioni sono state successivamente lavate con PBS e i nuclei colorati con DAPI. Essi sono stati poi montati usando FluorSave Reagent. Sono stati fatti anche controlli negativi, nei quali è stata omessa la lectina.

Determinazione del volume del letto vascolare nell'area di lesione

Il volume relativo del letto vascolare, per unità di volume di materia grigia, è stato stimato mediante il metodo di Weibel (1979). Un reticolo di punti è stato sovrapposto sulle immagini ottenute mediante microscopia confocale (tre per ogni animale) delle sezioni trasversali del corno ventrale, dopo colorazione con

lectina (vedi sopra). L'area attribuita ad ogni punto era $50 \mu\text{m}^2$. La dimensione dei vasi è stata dunque stimata contando i punti che cadevano sulla sezione di ciascun vaso ed essi sono stati arbitrariamente classificati in quattro classi: vasi coperti da 1 o 2 punti, da 3 o 4 punti, da 5 a 10 punti e più di 10 punti.

3. RISULTATI

3.1. ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO *IN VITRO*

3.1.1 ISOLAMENTO DELLE CELLULE DEL LIQUIDO AMNIOTICO: MORFOLOGIA E CURVE DI CRESCITA

Questo progetto di dottorato è stato condotto in collaborazione con la Clinica Ostetrica dell'Ospedale San Paolo, che ha fornito nove campioni di liquido amniotico prelevati da parti cesarei programmati di età gestazionale compresa tra la 37^a alla 39^a settimana.

Per la procedura di isolamento ci siamo avvalsi di due differenti metodi, previamente descritti in letteratura: il primo prevedeva l'utilizzo di un terreno commerciale (Amniomed), (Bossolasco et al, 2006), il secondo utilizzava un terreno con FGF, glutammina, e siero fetale bovino del quale sono state utilizzate due concentrazioni (20% e 10%) (Fauza et al, 2004).

Fatta eccezione del campione (5°PZ081008), risultato contaminato da sangue materno, da ciascun campione di liquido amniotico sono state isolate una o più culture cellulari le quali sono risultate essere costituite in prevalenza da uno dei tre tipi cellulari descritti in letteratura (Gosden et al., 1983): cellule di tipo fibroblastico, amniotico o epitelioide, più un quarto tipo di cellule di forma simile ad un fuso e di piccole dimensioni (Fig.3.1).

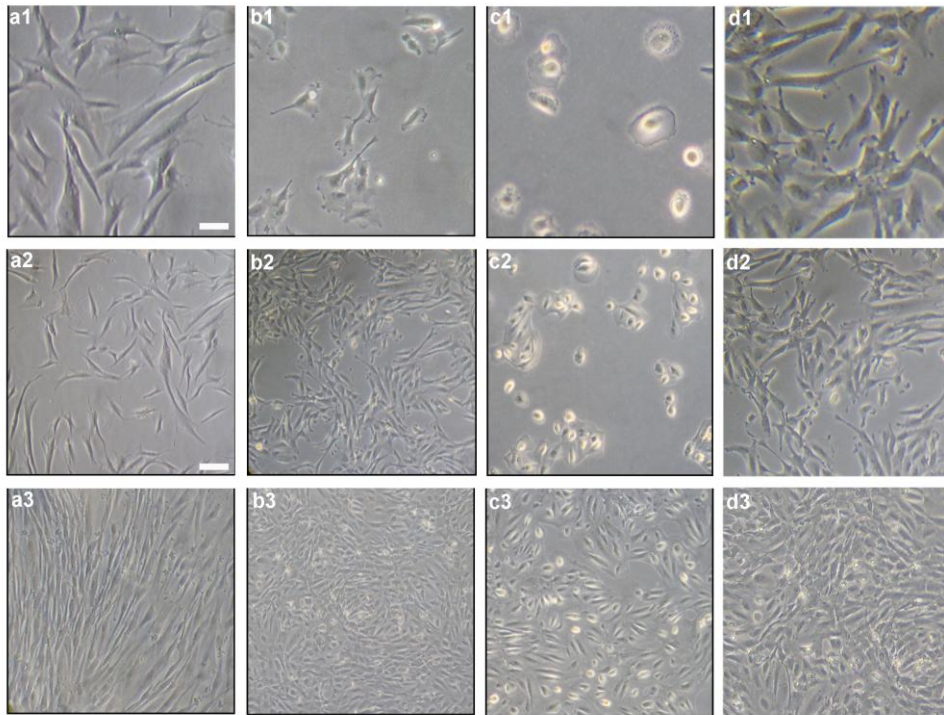


Fig.3.1: *Caratteristiche morfologiche delle cellule del liquido amniotico, ad alto e basso ingrandimento. a1, a2, a3: cellule tipo fibroblasto; b1, b2, b3: cellule tipo amniotico; c1, c2, c3: cellule epitelioidi; d1, d2, d3: fusiformi di piccole dimensioni. Barra: 20 μ m in a1, b1, c1 e d1; 40 μ m in a2, b2, c2, d2, a3, b3, c3 e d3. a2, b2, c2 e d2: cellule a bassa densità, a3, b3, c3 e d3: cellule a confluenza*

Di ciascuna coltura è stata studiata la capacità di proliferazione, mediante la determinazione della curva di crescita (Fig.3.2 e Fig.3.3):

- Campione 1 (1°PZ240108): Dal primo campione è stata isolata una singola coltura con cellule di morfologia di tipo amniotico. Le cellule hanno mantenuto un tasso di crescita esponenziale per circa 40 giorni di coltura continuativa, per poi rallentare gradualmente fino ad avere il plateau dopo circa 60 giorni.

-Campione 2 (2°PZ240108): Ne è stata isolata un'unica coltura costituita da cellule bipolari, prevalentemente di tipo epitelioidi con una subpopolazione di tipo fibroblastico. La coltura ha presentato un tasso di crescita notevolmente inferiore a quella delle altre popolazioni isolate e ha raggiunto il plateau in circa 3 settimane. La coltura è cresciuta con difficoltà producendo un numero complessivo di cellule alquanto esiguo da non poter permettere le successive analisi per la sua caratterizzazione ed è quindi stata esclusa dallo studio.

-Campione 3 (3°PZ060208): Sono state ottenute dieci colture cellulari dotate di caratteristiche morfologiche differenti. Di queste sono state selezionate per lo studio le colture #3.5, #3.6, #3.12 e #3.35. La coltura #3.12 è risultata composta prevalentemente da cellule di tipo epitelioidi, il cui tasso di crescita è calato drasticamente entro la terza settimana di coltura continuativa, raggiungendo il plateau. Le colture #3.5, #3.6 e #3.35 sono risultate composte principalmente da cellule di tipo fibroblastico, che presentano crescita esponenziale. All'interno della coltura #3.35 è stata rilevata la presenza di una subpopolazione di cellule di tipo amniotico. La coltura #3.5 ha presentato un tasso di crescita ridotto rispetto alle altre, arrestatosi dopo circa 35 giorni di coltura nonostante ciò ha prodotto un numero sufficiente di cellule da permetterne la caratterizzazione immunocitochimica, citofluorimetrica ed anche il trapianto in modelli murini di lesione spinale.

-Campione 4 (4°PZ270308): Da esso è stata isolata una singola coltura prevalentemente composta da cellule di tipo epitelioidi, con una subpopolazione

di cellule amniotiche che presentano un tasso di crescita esponenziale, sebbene più lento rispetto alle altre colture isolate, maggiormente proliferanti. La coltura non è stata in grado di produrre sufficienti cellule da permettere una adeguata caratterizzazione immunocitochimica e citofluorimetrica ed è quindi stata scartata.

-Campione 5 (5°PZ081008): Come precedentemente indicato, non è stato possibile isolare colture cellulari dal campione. La contaminazione da parte di sangue materno ha probabilmente danneggiato le cellule presenti, verosimilmente a causa della tossicità dei prodotti dell'emolisi.

-Campione 6 (6°PZ101208): Da esso sono state isolate solo due colture cellulari, una delle quali, la #6.2, è stata maggiormente studiata. Essa conteneva cellule di tipo epitelioide ed amniotico e una sottopopolazione di cellule fusiformi di piccole dimensioni. La coltura ha proliferato *in vitro* per circa 45 giorni con un tasso di crescita esponenziale prima di raggiungere un plateau attorno al 60° giorno.

-Campione 7 (7°PZ111208): Da questa paziente sono state isolate 27 colture, dalla morfologia prevalentemente amniotica e fibroblastica. Di dodici di esse è stata studiata la curva di crescita e 4 di esse, le colture #7.1, #7.5, #7.30, #7.42, sono state ulteriormente caratterizzate mediante immunofluorescenza e Real time PCR. La #7.5 risultava costituita da una commistione di cellule di tipo amniotico, epitelioide, fibroblastico e fusiforme, mentre la #7.42 era costituita invece, prevalentemente, da cellule di tipo fibroblastico. Le cellule della coltura #7.5 hanno mantenuto un tasso di proliferazione costante per circa 45 giorni prima di

raggiungere una fase di plateau, mentre le cellule della coltura #7.42 raggiungevano un plateau di crescita dopo circa 25-30 giorni.

-Campione 8 (8°PZ100209): Da questo campione, sono state isolate 5 colture (#8.10, #8.22, #8.25, #8.34, #8.43). Tra di esse, è stata particolarmente studiata la coltura #8.10, che risultava composta da cellule che presentavano tre delle quattro tipologie da noi descritte: amniotiche, fibroblastiche e fusiformi. La coltura ha proliferato in maniera esponenziale per oltre 70 giorni.

-Campione 9 (9°PZ120209): Da questa paziente sono state isolate 3 colture (#9.1, #9.14, #9.31), delle quali è stata poi utilizzata per lo studio *in vivo* la coltura #9.1, composta da cellule di tipo fusiforme, con una minore proporzione di cellule amniotiche. Questa coltura ha mantenuto le sue proprietà proliferative per un lungo periodo di tempo, oltre 90 giorni prima di raggiungere un plateau tra il 100° ed il 110° giorno di studio.

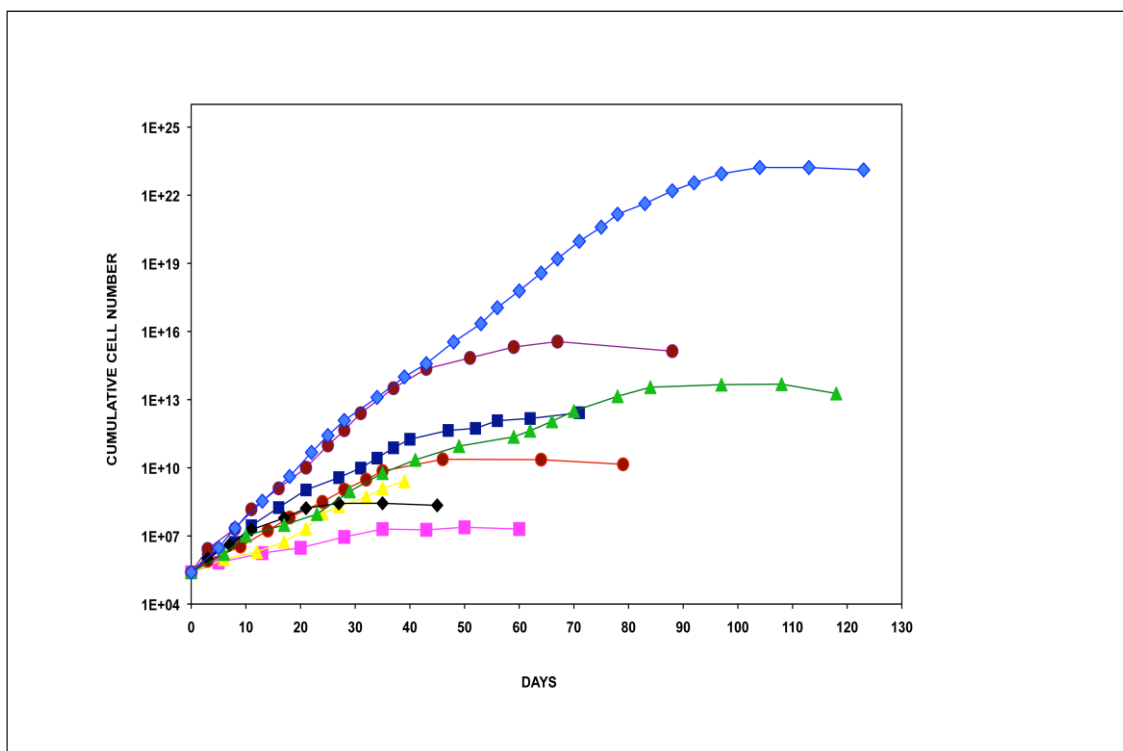


Fig.3.2: Curve di crescita delle colture derivate dai seguenti campioni: ■ #1.1, ■ #3.5, ▲ #3.6, ● #6.2, ○ #7.5, ◆ #7.42, ▲ #8.1, ◆ #9.1.

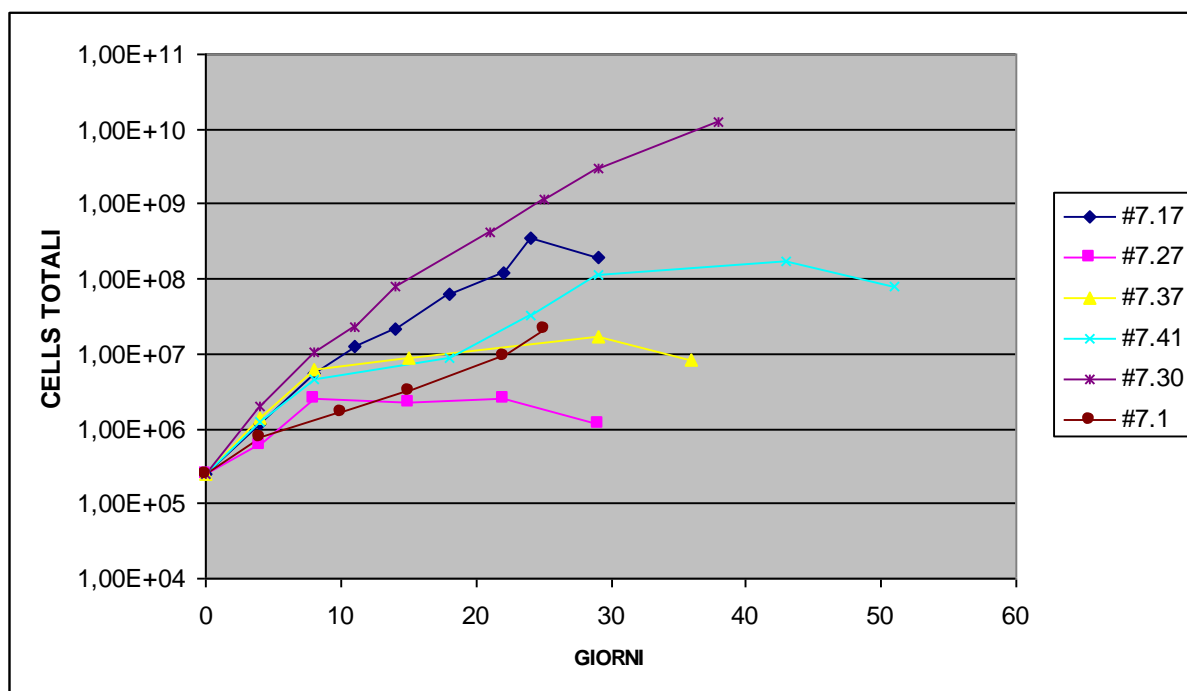


Fig.3.3: Comparazione delle curve di crescita di alcune delle colture derivate dalla ^A paziente: #7.1, #7.17, #7.27, #7.30, #7.37, #7.41

3.1.2 ORIGINE FETALE DELLE CELLULE ISOLATE

Allo scopo di confermare la provenienza fetale delle cellule isolate, prima di iniziarne lo studio esse sono state analizzate sia mediante PCR e successiva elettroforesi su gel, sia mediante analisi del cariotipo. In questo modo abbiamo appurato che per tutte le colture tranne quelle 9.x era rilevabile la presenza del cromosoma Y confermando che la loro provenienza era fetale. Al contrario per le colture della paziente 9 non possiamo escludere la possibilità che siano di origine “anche” materna (Fig.3.4).

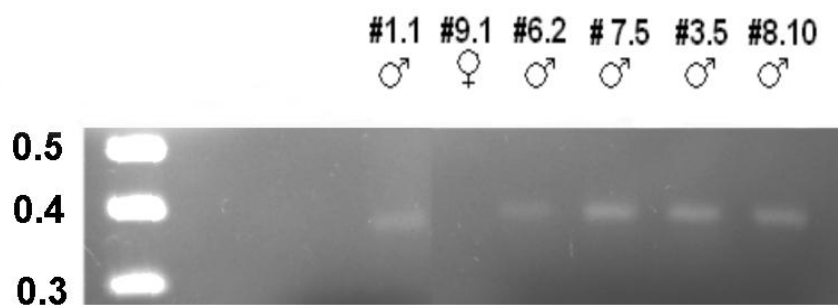


Fig.3.4: *Valutazione della presenza del cromosoma Y mediante PCR e successiva elettroforesi su gel, nelle colture studiate. Nei campioni #1.1, #6.2, #7.5, #3.5, #8.10 si conferma la presenza del cromosoma Y. Il campione #9.1 invece, risulta essere femmina.*

3.1.3 ANALISI DEL CARIOTIPO

L'analisi del cariotipo è stata effettuata, oltre che per verificare la provenienza fetale delle colture isolate, allo scopo di verificare che le cellule, dopo numerosi passaggi in coltura, avessero mantenuto un cariotipo normale. Essa è stata effettuata mediante colorazione di Gimsa e ha mostrato, come si può vedere dal cariotipo rappresentativo mostrato in figura, che nessuna delle colture analizzate presenta, riarrangiamenti cromosomici, né a bassi né ad alti passaggi (Fig.3.5).

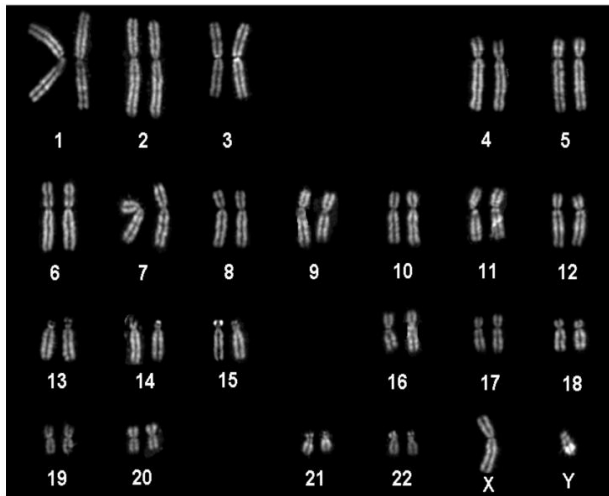


Fig.3.5: *Cariotipo della coltura #1.1, dopo colorazione di Gimsa.*

-

3.1.4 MISURAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI

I telomeri sono strutture costituite da piccole sequenze di DNA ripetuto, localizzate al termine dei cromosomi eucariotici. Data l'impossibilità della DNA Polimerasi- α , durante il ciclo cellulare, di replicare l'estremità del DNA lineare, nelle cellule somatiche le estremità dei cromosomi si accorciano progressivamente nel corso delle replicazioni e questo fenomeno, dimostrato sia *in vitro* che *in vivo*, ha come conseguenza la limitata capacità proliferativa delle cellule somatiche "normali". Le cellule staminali, invece, le cellule tumorali e le cellule germinali possiedono una vita più lunga o sono addirittura immortali, poiché possiedono meccanismi tali da permettere il mantenimento della lunghezza dei loro telomeri, che nel caso delle staminali embrionali si aggira intorno a un valore di 12-15 kbp. La misurazione della lunghezza dei telomeri riveste quindi un ruolo cruciale nel definire le caratteristiche di "staminalità" di una popolazione cellulare ed è a

questo scopo che abbiamo analizzato la lunghezza dei telomeri nelle colture #1.1, #3.5, #7.42, #7.5, #9.1, #6.2, a bassi e alti passaggi.

Nella Fig.3.6 è mostrata la lunghezza dei telomeri delle colture #9.1 e #7.42, e come controllo positivo interno dell'esperimento è stato utilizzato DNA di cellule tumorali. La coltura #9.1 presenta telomeri della lunghezza di 7.27 Kb, anche dopo 21 passaggi in coltura, mentre la coltura #7.42 mostra, anche ad alti passaggi, telomeri della lunghezza di circa 10 Kb.

Tali valori non sono molto lontani da quelli medi delle cellule staminali embrionali riportati in letteratura (Allen et al., 2009, Blasco M.A., 2007; Flores et al., 2006), che raggiungono in certi casi anche le dimensioni di 12-15 kb. Il risultato ottenuto ci fa quindi ben sperare circa le proprietà di "staminalità" delle cellule analizzate.

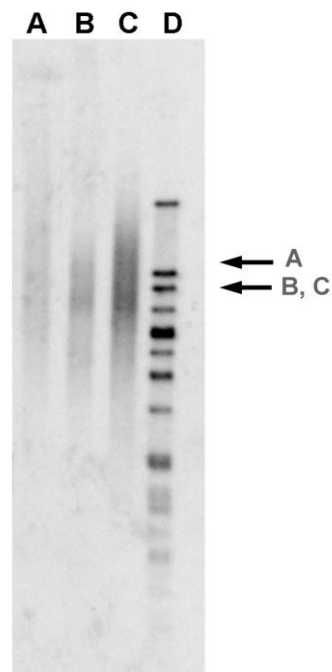


Fig.3.6: *Analisi della lunghezza dei telomeri. A #9.1, B #7.42, C controllo positivo, D: marcatori di peso molecolare. Le frecce indicano la lunghezza dei telomeri per i campioni A e B-C*

3.1.5 CARATTERIZZAZIONE DELLE COLTURE ISOLATE

Le colture isolate, esse sono state analizzate, a vari passaggi, sia mediante studi di biologia molecolare (effettuati sia sulle cellule native che differenziate) che, per quanto riguarda l'espressione genica, mediante immunofluorescenza e citofluorimetria.

- Studi di Real Time PCR

Abbiamo effettuato una analisi di espressione genica sulle varie colture da noi ottenute, utilizzando un pannello di geni quali Nestina, GFAP, OCT-4 ed NG2, antigeni tipici di un profilo di tipo neurale, che sarebbe desiderabile per le finalità del nostro studio. Le colture hanno mostrato un profilo di espressione genica variabile nel tempo (Tab.3.1).

Le Real time PCR sono state valutate con il metodo del $\Delta\Delta C(t)$, normalizzando per il gene housekeeping e quindi il risultato per il valore minore interno ai singoli geni .

L'espressione del gene OCT-4 in particolare tende in ogni coltura a subire una riduzione dei livelli di espressione nel tempo, con la sola eccezione delle colture #6.2 e #9.1.

		NEURAL-GLIAL CELLS			STEM CELL
SAMPLES		NESTIN	GFAP	NG2	OCT4
CULTURES	PASSAGES				
# 1.1	5	++	++	++	+
# 1.1	11	-	-	-	-
# 3.5	4	++	++	+++	-
# 3.5	6	-	-	++	-
# 3.6	6	-	+	++	-
# 6.2	3	-	-	+	+
# 6.2	8	-	-	-	+
# 7.5	5	+	+	++	+
# 7.5	7	+	+	++	-
# 8.10	3	+	+++	++	++
# 8.10	5	-	-	-	+
# 9.1	3	++	+	++	++
# 9.1	8	-	+	+	++

Tab.3.1: *Analisi in Real Time PCR effettuata su varie colture, a vari passaggi. Nell'effettuare l'analisi, il campione con il più basso livello di espressione è stato utilizzato come valore di riferimento ($\Delta\Delta CT=0$; $2^{-\Delta\Delta CT}=1$): #1.1 P11 per nestina,*

GFAP e OCT4; #6.2 P8 per NG2. I livelli di espressione in tabella sono indicati con i seguenti simboli: -; + (se il loro valore è compreso tra 1 e 4), ++ (se compreso tra 4 e 16), +++ (se compreso tra 16 e 64), ++++ (se più di 64)

- Studi di immunofluorescenza

Tramite immunofluorescenza indiretta su cellule siamo andati a valutare la presenza di marcatori di tipo neurale (nestina, GFAP, i neurofilamenti H, β tubulina III e NG2), mesodermico (vimentina), epiteliale (citocheratina 8-18) e di marcatori di cellule indifferenziate (OCT4 e musashi). I risultati ottenuti sulle colture #3.5, #7.1 e #7.30 sono mostrati in Fig.7, 8 e 9.

La tabella sottostante (Tab.3.2) mostra i risultati dell'analisi effettuata, a bassi e ad alti passaggi, su tutte le colture analizzate. Esse mostrano la comune espressione di marcatori di tipo neurale (Nestina, β tubulina, GFAP, NeurH), mesenchimale (Vimentina) e del marcatore di cellule indifferenziate OCT4 (tranne nella coltura #3.6). Inoltre, alcune delle colture (#3.5, #3.6, #7.5) esprimono il marcatore neurogliale NG2 e solo due esprimono il marcatore epiteliale citocheratina 8-18. Nessuna di esse esprime invece il marcatore musashi.

		MARKERS								
		NEURAL-GLIAL CELLS							STEM CELLS	
SAMPLES		CK8-18	VIMENTIN	NESTIN	TUJ1	NG2	GFAP	NFH	MUSASHI 1	OCT4
CULTURES	PASSAGES									
# 1.1	8/15	-	+	+	+	-	+	+/-	-	+
# 3.5	7/10	-	+	+	+	+	+	+/-	-	+
# 3.6	8	-	+	+	+	+	+	+/-	-	-
# 6.2	4/16	+	+	+	+	-	+	+/-	-	+
# 7.5	3/10	+	+	+	+	+	+	+/-	-	ND
# 8.10	3/13	-	+	+	+	-	+	+/-	-	+
# 9.1	4/17	-	+	+	+	-	+	+/-	-	+

Tab.3.2: *Analisi immunocitochimica delle colture #1.1, #3.5, #3.6, #6.2, #7.5, #8.10, #9.1, a differenti passaggi. In tabella è mostrata l'espressione dei seguenti marcatori: il marcatore neurogliale nestina, GFAP, β -tubulina III (TuJ1), neurofilamenti (NFH), NG2, il marker mesenchimale vimentina, il marker epiteliale citocheratina 8-18, i fattori di trascrizione musashi1 e Oct4.*

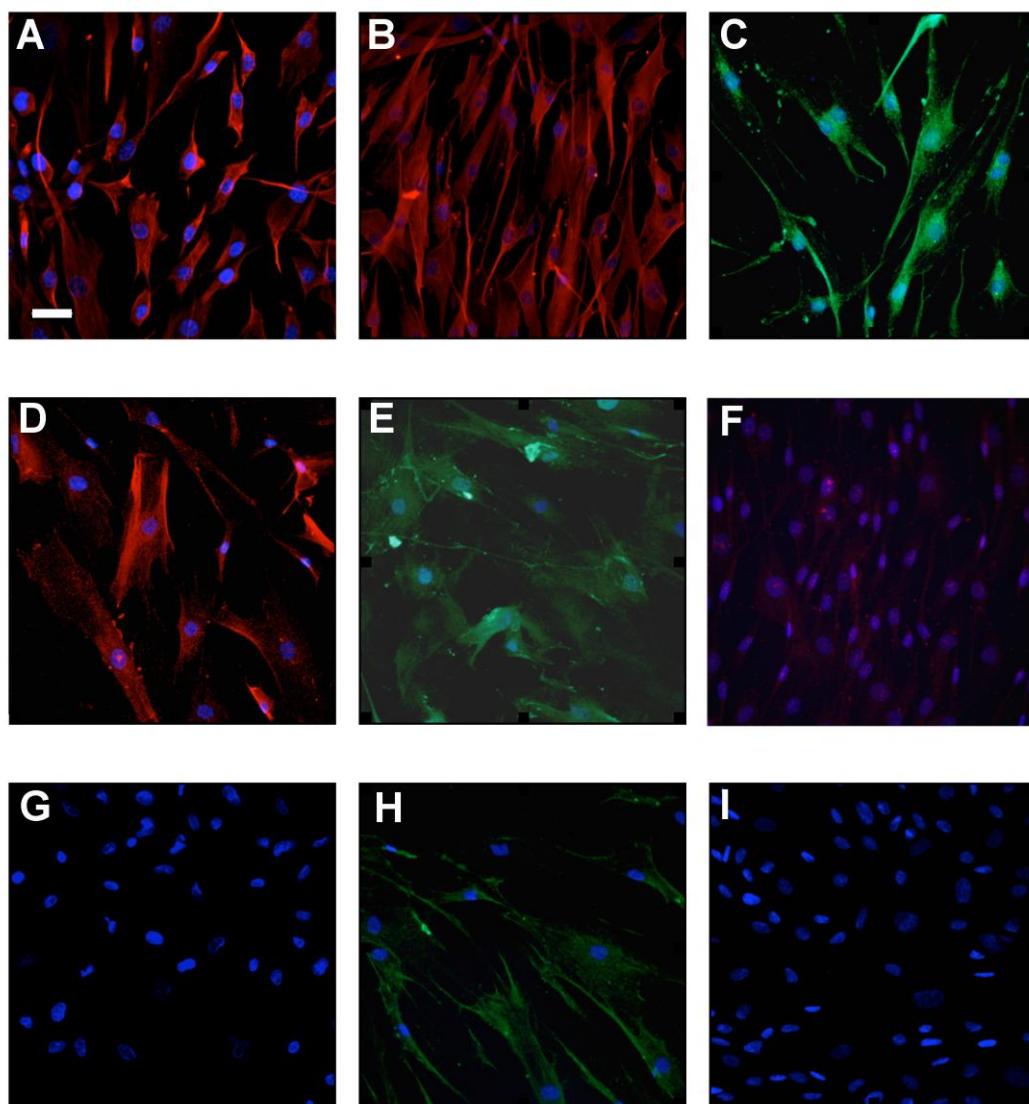


Fig.3.7: *Analisi immunicitochimica della coltura #3.5, come rappresentativa delle colture analizzate. A: vimentina; B: TUJ1; C: GFAP; D: Nestina; E: Neurofilamento H; F: Oct4; G: Musashi; H: NG2; I: Citocheratina 8-18. Barra: 50 μ m*

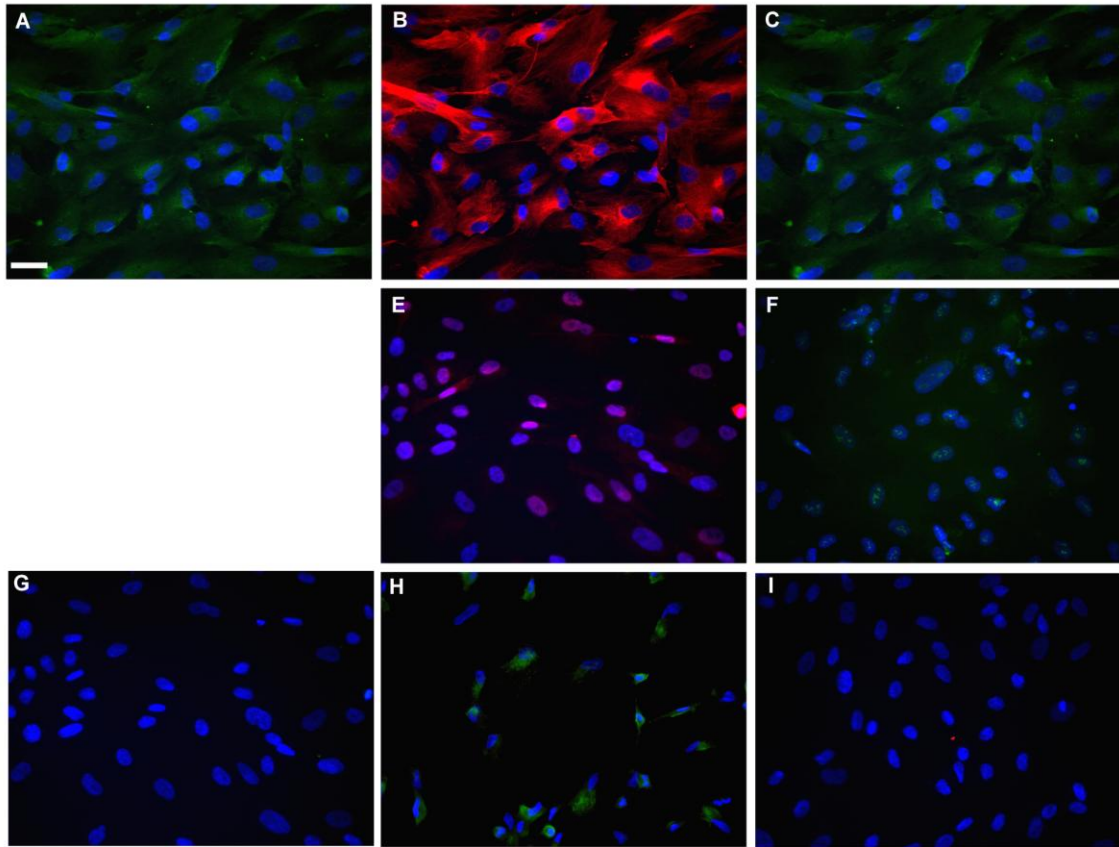


Fig.3.8: *Analisi immunitocitochimica della coltura #7.1. A: vimentina; B: TUJ1; C: GFAP; E: Neurofilamento H; F: Oct4; G: Musashi; H: NG2; I: Citocheratina 8-18. Barra: 50 μ m*

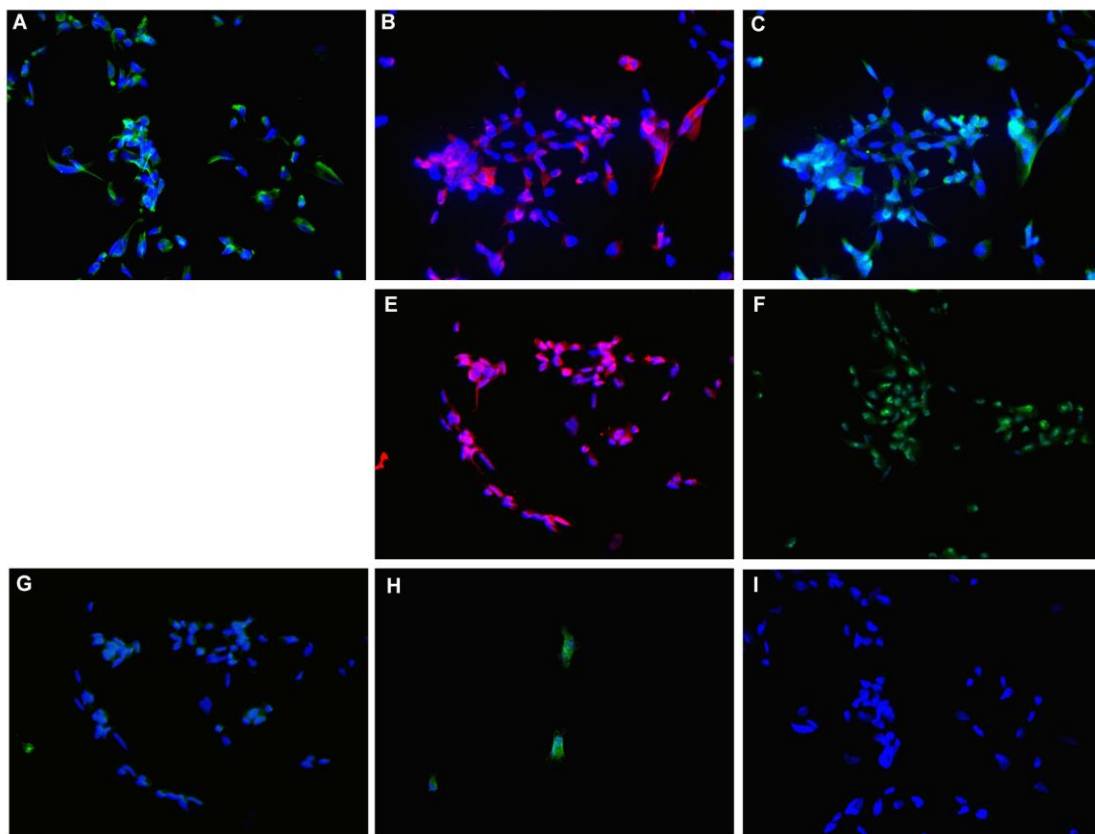


Fig.3.9: *Analisi immunocitochimica della coltura #7.3. A: vimentina; B: TUJ1; C: GFAP; E: Neurofilamento H; F: Oct4; G: Musashi; H: NG2; I: Citocheratina 8-18.*
Barra: 50 μ m

- Analisi citofluorimetrica

L'analisi dell'immunofenotipo è stata effettuata anche mediante citofluorimetria a flusso (FACS), utilizzando un pannello di antigeni comprendente marcatori di tipo mesenchimale-perivascolare, muscolo-neurale, endoteliale, epiteliale, embrionale e staminale. L'analisi effettuata ha mostrato differenze fenotipiche tra le colture analizzate. (Tab.3.3).

La coltura #1.1 è risultata avere un marcato differenziamento in senso endoteliale, epiteliale o ematopoietico (CD 31-, CD144-, CD 34-, CD 45-, negativa per citocheratine, E-caderina, MUC-1). Presenta gli antigeni di istocompatibilità di

classe I ed esprime il marcatore embrionale SSEA-4. La coltura presenta un indirizzamento verso il fenotipo perivascolare con un'elevata percentuale di cellule esprimenti il marcatore CD 146 e risultando negativa per i marcatori endoteliali maturi. Il 5-15% delle cellule esprime CD133.

La coltura #3.6, pur presentando lo stesso differenziamento in senso endoteliale della precedente ed esprimendo gli stessi antigeni di istocompatibilità e lo stesso marcatore embrionale, si caratterizza per la presenza del marcatore di staminalità CD117 e per l'espressione di un fenotipo mesenchimale più maturo (CD 146+, CD73+, CD105+, CD90+), maggiormente indirizzato verso il fenotipo muscolo-neurale (Cd146+, NG2+, CD56+).

La coltura #3.5 presenta un fenotipo analogo al precedente, da cui si differenzia solo per la mancata espressione di CD117, per una più massiccia espressione di CD146 (100% delle cellule testate) e per una più ridotta espressione di CD 90 (circa 35% del campione rispetto al 100% della precedente). Entrambe le colture sono positive per NG2 (100% del campione).

Le rimanenti colture (#6.2, #7.5, #8.10, #9.1) si caratterizzano anch'esse per l'elevata espressione di marcatori di tipo mesenchimale-perivascolare, quali CD146, CD73 o CD90, e per l'assenza del marcatore CD105, espresso invece ad alti livelli nelle colture #3.5 e #3.6. La coltura #7.5 mostra inoltre l'elevata espressione del marcatore neurogliale NG2, espresso invece a livelli inferiori nelle colture #6.2 e #8.10, e praticamente assente nella coltura #9.1.

Quest'ultima mostra inoltre marcata espressione del marcatore muscolo neurale CD56 (100%).

Dall'analisi effettuata sul campione fresco, invece, si è potuta osservare la prevalente espressione di marcatori di tipo epiteliale ed endoteliale, dovuta al prevalere nel campione fresco di tali tipi di cellule, poi perse dopo la messa in coltura.

SAMPLES		MARKERS																		
		HEMATOPOIETIC STEM CELLS		ENDOTHELIAL CELLS			EPITHELIAL CELLS			EMBRYONIC STEM CELLS	STEM CELLS	MESENCHYMAL- PERIVASCULAR CELLS				MUSCLE- NEURAL CELLS			MHC ANTIGENS	
CULTURES	PASSAGES	CD45	CD34	CD133	CD31	CD144	PAN CK/CK8-18	MUC1	CADHERIN	SSEA4	CD117	CD146	CD73	CD90	CD105	CD56	NG2	NGFR	HLA-DR	HLA-ABC
# 1.1	5 / 7	-	-	+ 10 %	-	-	-	-	-	+	-	+ 94 %	+ 96 %	+ 96 %	-	+ 96 %	-	-	-	+
# 3.5	2 / 5	-	-	+ 10 %	-	-	-	-	-	+	-	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	+ 34 % 0 %	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	-	-	+
# 3.6	4 / 6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+ 53 %	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	-	-	+
# 6.2	6	-	-	-	+ 7 %	-					-	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	+ 52 %	-	+ 36 %	+ 7 %		-	+
# 7.5	11	-	-	-	+ 12 %	-					-	+ 98 %	+ 10 % 0 %	+ 90 %	-	+ 43 %	+ 10 % 0 %		-	+
# 8.10	5	-	-	-	-	-					-	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	-	+ 75 %	+ 25 %		-	+
# 9.1	8	-	-	-	+ 5 %	-					-	+ 10 % 0 %	+ 10 % 0 %	+ 60 %	-	+ 10 % 0 %	-		-	+
FRESH SAMPLES		-	-	+ 41 %	+ 15 %	-		+ 50 %	+ 47 %		+ 15 %	+ 20 %	+ 5 %	+ 23 %	-	+ 26 %	+ 4 %		-	+

Tab.3.3: *Analisi citofluorimetrica di differenti colture (#1.1, #3.5, #3.6, #6.2, #7.5, #8.10, #9.1) a differenti passaggi e del campione fresco. I numeri indicano la percentuale di cellule positive; il segno – indica che il livello di espressione non era visibile mediante analisi citofluorimetrica.*

3.1.6 SAGGI DI DIFFERENZIAMENTO

La capacità di automantenimento e differenziamento è prerogativa delle cellule staminali. Al fine di verificare se le cellule da noi isolate avessero, oltre alla capacità di proliferazione, anche quella di differenziamento, abbiamo effettuato saggi di differenziamento adipogenico, osteogenico e neurogenico, seguendo dei protocolli già riportati in letteratura (De Coppi et al, 2007, Perin et al, 2008).

I test effettuati *in vitro* sulle colture in studio hanno fornito i seguenti risultati:

- **Adipogenesi:** il differenziamento adipogenico è stato condotto sulle colture #1.1, #3.35, #3.5, #3.6, #9.1 e #7.30. Dopo tre settimane di trattamento, all'interno delle cellule, fissate e colorate con Oil Red O, si è potuta osservare la deposizione di numerose gocce lipidiche di piccole dimensioni; in particolare, la coltura #3.5 (Fig.3.10, A) mostrava la deposizione del maggior numero di gocce e dalle dimensioni maggiori.

Dal punto di vista morfologico, si è potuto osservare nelle colture trattate, mediante osservazione al microscopio, una variazione della morfologia, che assumeva nel corso del trattamento (in particolare per la coltura #3.5) un aspetto sempre più tondeggiante.

I controlli dell'esperimento, costituiti dalle cellule provenienti dalle medesime colture non trattate e dai fibroblasti umani (non mostrati), non hanno evidenziato, in seguito a colorazione, alcuna deposizione lipidica al loro interno (Fig.3.10, D).

- **Osteogenesi:** il differenziamento verso la linea osteogenica è stato effettuato sulle colture #1.1, #3.5, #6.2, #7.5, #8.10 e #9.1. In seguito a stimolazione, solo le cellule della coltura #3.5 hanno mostrato, dopo tre settimane di trattamento, in seguito a fissazione e colorazione con Alizarin Red, una apprezzabile deposizione di minerali di calcio.

Nelle altre colture studiate non si è potuta osservare alcuna deposizione di minerale (Fig.3.10, B-E).

- **Neurogenesi:** le cellule delle colture #1.1, #3.13, #3.34, #3.5, #3.6, #6.2, #7.5, #8.10 e #9.1 sono state sottoposte a tre diverse stimolazioni neurogeniche, come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

Dopo circa 7 giorni, le cellule sono state fissate ed è stata valutata l'espressione del marcatore neuronale β tubulina III e di quello astrocitario GFAP.

Dopo osservazione al microscopio ottico, solo alcune delle cellule delle colture #3.34, #3.6 e #3.5 che erano state sottoposte a stimolazione neurogenica secondo il terzo metodo descritto in Materiali e Metodi (Kim et al, 2007: 1° giorno: DMEM bassa concentrazione di glucosio, FBS al 20%, 20 ng/ml di bFGF e 20 ng/ml di EGF; 2° giorno: DMEM/F12, DMSO al 2%, 0.2 mM di butylated hydroxyanisole, 25 mM di KCl, 2 mM di acido valproico, 1 μ M di idrocortisone e supplemento N2, per 7 giorni) mostravano una morfologia simile a quella neuronale, pur continuando ad esprimere entrambi i marcatori analizzati. L'analisi al microscopio a fluorescenza ha mostrato, infatti, che i livelli di espressione di GFAP e β tubulina III erano paragonabili a quelli delle cellule non differenziate, indicando che le colture analizzate non si erano indirizzate così né verso il fenotipo neuronale, né gliale.

La morfologia “spinosa” da esse assunta rispetto ai controlli e la presenza di lunghi processi sono mostrati in Fig.3.10, C-F.

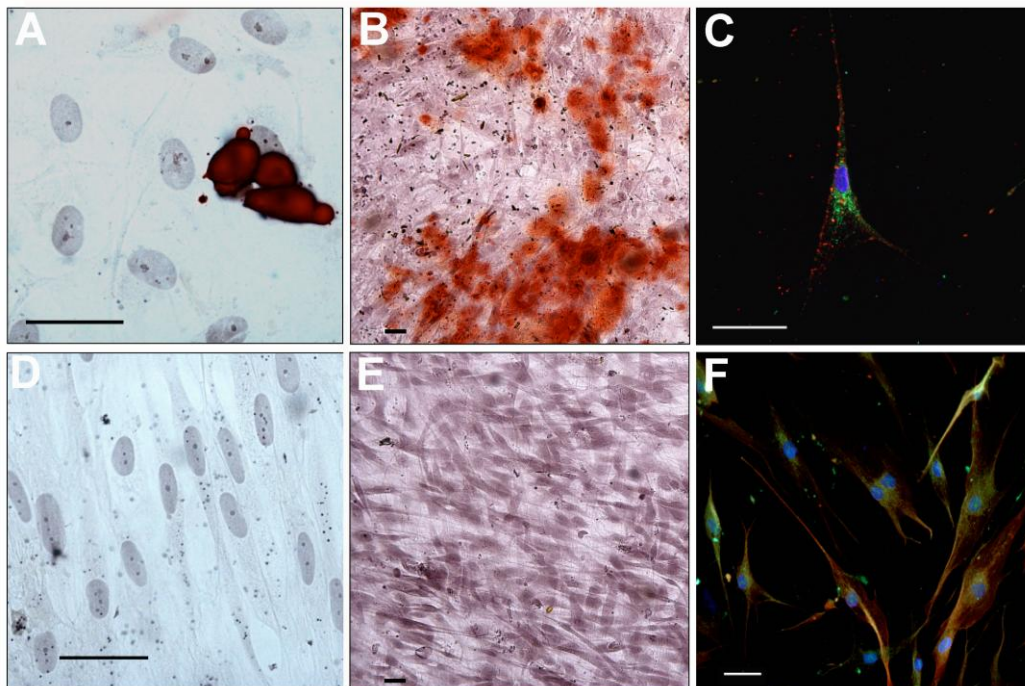


Fig.3.10: *Differenziamento delle colture di cellule isolate nella linea adipogenica, osteogenica e neurogenica. I controlli sperimentali (controlli negativi) sono stati fatti usando le stesse colture, mantenute durante tutta la durata del differenziamento nel terreno di crescita standard. A: colorazione con Oil red O della coltura #3.5, mantenuta per 3 settimane in terreno adipogenico; D: cellule controllo per l'adipogenesi. B: colorazione della coltura #3.5, mantenuta per 3 settimane in medium osteogenico. E: cellule controllo per i trattamenti osteogenici. C: immunofluorescenza della coltura #3.5 mantenuta per 3 settimane in medium neurogenico; F: cellule controllo per i trattamenti neurogenici. Barra: 40μm*

3.1.6 a Analisi dell'espressione genica dopo differenziamento

Per studiare la variazione dell'espressione genica in seguito a differenziamento, i trascritti delle colture analizzate, dopo essere state sottoposte a stimoli differenziativi, sono stati studiati mediante Real time PCR.

- Differenziamento osteogenico: i campioni delle colture #1.1, #6.2, #8.10 e #9.1, dopo essere stati sottoposti a stimoli differenziativi, mostravano un significativo aumento delle quantità di trascritto per il gene RUNX2 rispetto al controllo, mentre nessun campione è risultato essere positivo per il gene dell'osteocalcina, gene più tardivo, specifico degli osteoblasti maturi.
- Differenziamento adipogenico: in tutti i campioni studiati si è potuto osservare un aumento dell'espressione del gene PPAR- γ -C1 α , tendenzialmente significativo rispetto ai controlli, mentre l'espressione del gene PPAR 2 risultava aumentata nelle colture #3.5 e #9.1. L'espressione del gene della leptina invece, caratteristica dell'adipocita maturo, risultava aumentata solo nella coltura #3.5.

.

3.2 STUDI *IN VIVO* E VALUTAZIONE DEL RECUPERO MOTORIO

3.2.1 ANALISI DEL RECUPERO MOTORIO NEGLI ANIMALI TRAPIANTATI CON AFCs

Il trapianto di cellule AFCs nel nostro modello contusivo di lesione spinale è stato condotto utilizzando le colture #1.1, #3.5, #3.6, #9.1. L'analisi del recupero

motorio negli animali trapiantati e dei relativi controlli, trapiantati con solo PBS, è stata eseguita mediante la scala di valutazione BMS (Basso Mouse Scale) precedentemente descritta (vedi Materiali e Metodi). Tale analisi ha fornito i seguenti risultati (Fig.3.11):

-Coltura #1.1: il trapianto di cellule della coltura #1.1 non ha determinato un recupero motorio significativamente differente rispetto agli animali di controllo ovvero essi hanno raggiunto un valore medio sulla scala della BMS pari a 2,75 (posizionamento plantare con o senza supporto del peso).

-Coltura #3.5: gli animali trapiantati con cellule di questa coltura presentavano un recupero motorio significativamente differente rispetto ai controlli raggiungendo un valore di 4,82 sulla scala BMS (corrispondente a frequente o consistente passo plantare, in assenza di coordinazione), che risulta essere significativamente differente ($P < 0,01$) rispetto al valore medio di 3,86 raggiunto dai controlli (occasionale passo plantare).

-Coltura #3.6: anche i topi trattati con tali cellule hanno mostrato un recupero motorio significativamente superiore rispetto ai controlli, attestandosi ad un valore medio di 4,58 sulla scala BMS, corrispondente ad un recupero della capacità motoria degli arti posteriori tale da permettere un occasionale o frequente passo plantare. Tale valore è risultato significativamente differente rispetto ai controlli ($P < 0,05$)

-Coltura #9.1: il trattamento con cellule della coltura #9.1 non ha determinato un recupero motorio significativamente differente rispetto ai controlli. Il punteggio ottenuto per gli animali trapiantati con queste cellule, dopo 4 settimane, risultava pari a 4, corrispondente a un occasionale passo plantare.

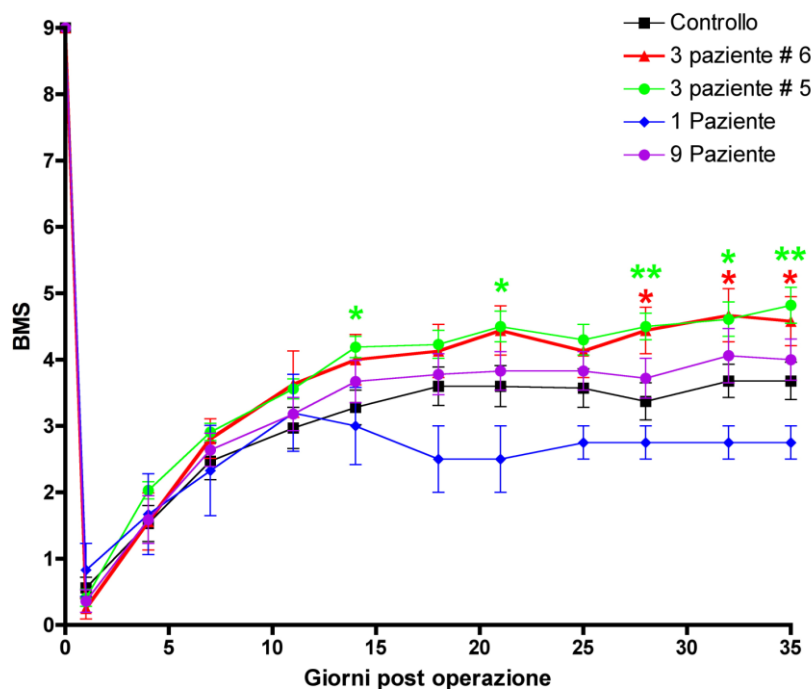


Fig.3.11: Risultati del trapianto sul recupero motorio negli arti posteriori degli animali trattati con le colture #1.1, #3.5, #3.6, #9.1 e solo veicolo (PBS). Il recupero motorio osservato è stato valutato mediante la scala di valutazione BMS, partendo dal giorno precedente l'operazione. Simboli di significatività per la differenza rispetto al controllo (in nero): * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$.

3.2.2 ANALISI DELLA PRESENZA DI CELLULE UMANE MARCATE NEL MIDOLLO DEI TOPI TRAPIANTATI

Il trapianto per via endovenosa delle cellule AFCs in animali lesionati pone la domanda di quale sia il loro destino nel nostro modello animale. La presenza di cellule AFCs marcate mediante Qdot (Qtracker 655 Cell Labeling Kit, Invitrogen, vedi Materiali e Metodi) nel sito di lesione ad un mese dalla somministrazione, è

stata studiata mediante osservazione al microscopio confocale. Il segnale della marcatura osservato *in vivo*, nonostante indebolito rispetto a quanto osservabile *in vitro* a causa delle condizioni ambientali in cui è effettuata la rilevazione, ha permesso di individuare la presenza delle cellule marcate migrate nella zona di lesione, fino a 4 settimane dal trapianto (Fig.3.12).

Allo scopo di verificare la clearance delle cellule trapiantate in vari tessuti, quali cuore, polmone, milza, fegato e cervello, nei topi trapiantati è stata poi effettuata un'analisi di tali organi, mediante microscopia confocale, allo scopo di individuare la presenza delle cellule marcate in tali organi, a vari tempi dopo il trapianto. Un numero significativo di cellule è stato rilevato nella milza degli animali una settimana dopo il trapianto, indice del fatto che molte delle cellule non avessero migrato quindi verso il sito di lesione, ma fossero invece state "fagocitate" negli organi filtro (Fig.3.13 e 3.14). La presenza di tali cellule nei suddetti tessuti non era invece rilevabile un mese dopo il trapianto.

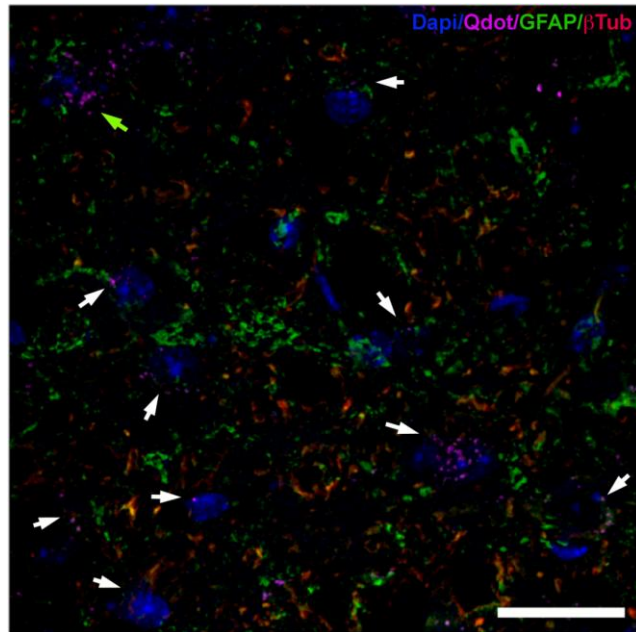


Fig.3.12: *Valutazione in vivo della presenza di cellule marcate mediante Qdot, a 4 settimane dal trapianto, nel sito di lesione. Colorazione: GFAP (verde), DAPI (blu), Qdot (magenta). La freccia verde in alto evidenzia una cellula che esprime il solo marcatore GFAP. Barra di scala: 50 μ m*

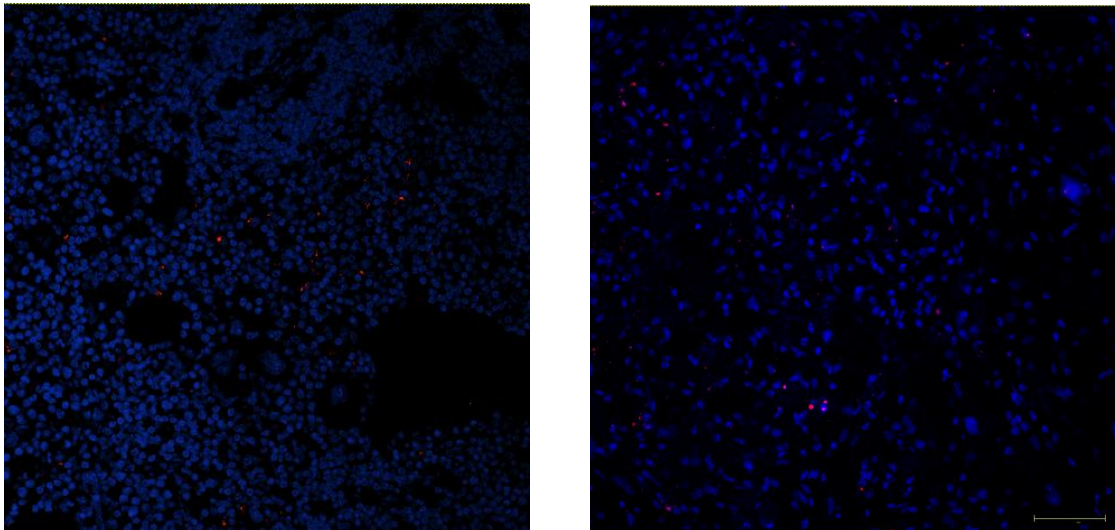


Fig.3.13: *Presenza di cellule marcate con Qdot a 1 settimana dal trapianto nella milza (A) e nella zona di lesione all'interno del midollo spinale (B). Colorazione: Qdot (magenta) DAPI (blu). Barra di scala 75 μ m.*

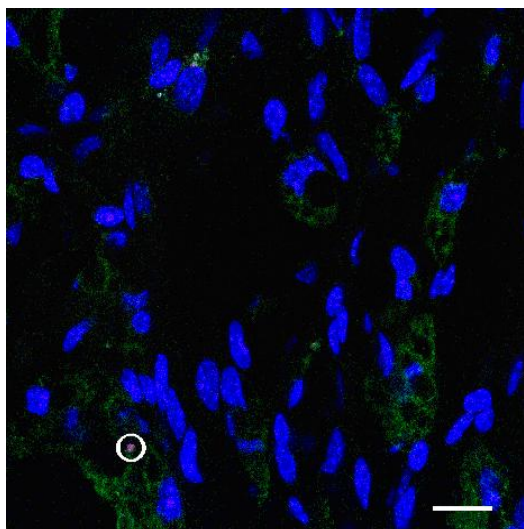


Fig.3.14: *Presenza di tracce di marcatura con Qdot in corrispondenza di macrofagi. Colorazione: DAPI (blu), Qdot (magenta), ED1 (verde).*

3.2.3 VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI MIELINA NELL'AREA DI LESIONE

La distruzione delle vie ascendenti e discendenti della sostanza bianca è la causa primaria dei deficit motori osservati dopo la lesione spinale e l'estensione della perdita di fibre nervose, che inizialmente dipende dalla severità del trauma meccanico, è notevolmente aumentata durante la fase di danno secondario.

La preservazione della sostanza bianca dal danno secondario riveste quindi un ruolo cruciale nel limitare i deficit funzionali delle vie motorie e sensoriali, come dimostrato dal fatto che sia uno dei target primari nel trattamento della lesione spinale acuta (Vitellaro-Zuccarello et al, 2007).

Alla ricerca di una spiegazione del recupero motorio osservato negli animali trapiantati, siamo quindi andati a paragonare i livelli di mielina negli animali trattati con le cellule e negli animali trattati con PBS, e ciò è stato fatto a livello della sostanza bianca ventrale, in quanto in letteratura

(Loy et al, 2002) è descritto che a questo livello siano presenti vie in grado di vicariare i circuiti dorsali danneggiati in seguito a danno.

Come mostrato (Fig.3.15, A, B e C), l'analisi dei livelli di mielina nell'intorno della zona di lesione (rostralmente fino a 3,5 mm e caudalmente fino a 1.5 mm), a 4 settimane dopo il trapianto, ha mostrato la presenza di una significativa preservazione della mielina negli animali trattati con le cellule delle colture #3.5 e #3.6 rispetto agli animali trattati con solo veicolo.

L'analisi dei livelli di mielina 1 settimana dopo il trapianto, invece, non ha mostrato differenze significative tra gli animali trapiantati con cellule e gli animali controllo.

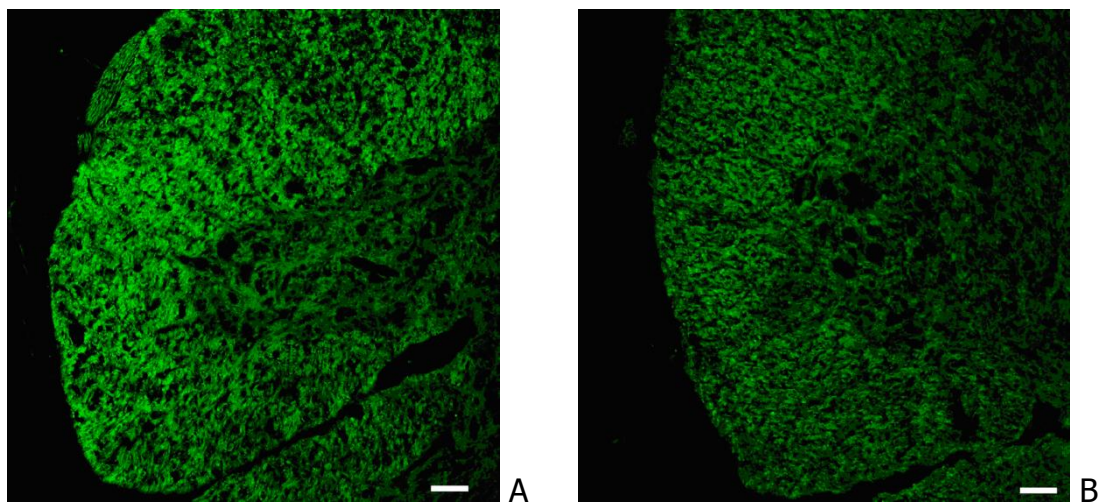


Fig.3.15 A,B: *Valutazione della conservazione della mielina su sezioni trasversali di midollo spinale di animali lesionati e trattati con cellule del liquido amniotico (A) o iniettati con il solo PBS (B). Gli animali sono stati sacrificati a 5 settimane dalla lesione e le sezioni sono state colorate con FluoroMyelin. E' stata quindi fatta l'analisi al confocale dei livelli di mielina presente nella sostanza bianca della zona*

ventrale del midollo tra topi trapiantati e topi di controllo. L'acquisizione dei dati e la successiva analisi è stata fatta al confocale. Barra=50 μ m.

C

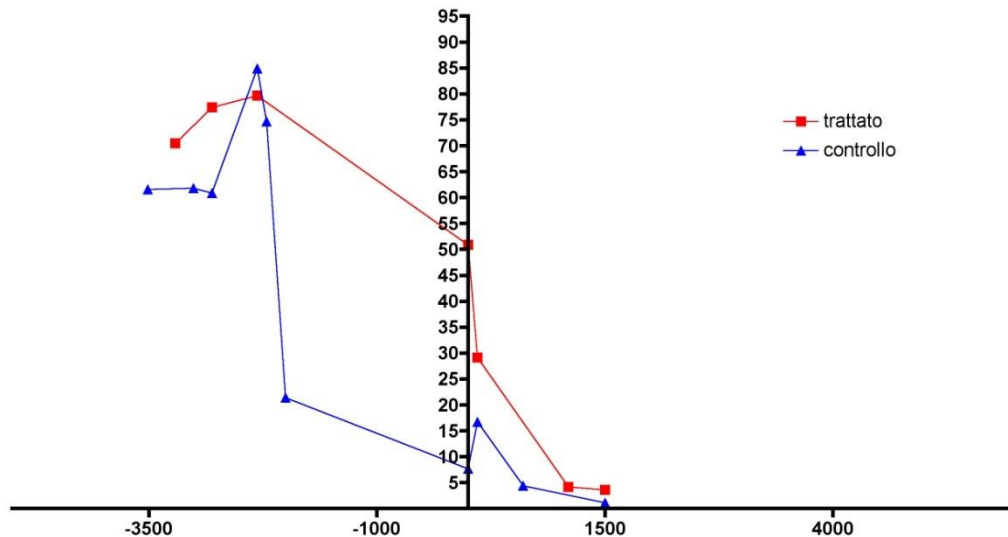


Fig.3.15 C: *Preservazione della mielina. Confronto tra topi trattati con AFCs e topi controllo. L'analisi è stata effettuata a livello della materia bianca ventrale, in una regione che si estendeva per più di 4 mm intorno all'area di lesione*

3.2.4 MISURAZIONE DEI LIVELLI DI LECTINA

L'importanza dei livelli di flusso sanguigno dopo lesione spinale è da tempo dimostrata (Hagg and Oudega, 2006; Loy et al, 2002). Il danno iniziale ai vasi nel sito di lesione risulta decisivo nell'evoluzione degli eventi che compaiono successivamente durante il danno secondario (Mautes et al, 2000) e lo sviluppo di trattamenti mirati all'aumento della vascolarizzazione nella fase acuta della lesione, risulterebbe dunque cruciale per la riparazione tissutale in seguito al danno meccanico.

Per studiare l'effetto del trapianto delle cellule provenienti da liquido amniotico sui livelli di vascolarizzazione abbiamo dunque effettuato la misurazione dei livelli di lectina su sezioni trasversali, a livello del corno ventrale, rostralmente alla zona di lesione. A un mese dal trapianto, si è potuto osservare un significativo aumento del numero dei vasi nei midolli degli animali trapiantati con le cellule della coltura #3.6 e #3.5 rispetto ai midolli degli animali trapiantati con solo veicolo (Fig.3.16 e 3.17).

Nessuna differenza è stata invece osservata negli animali trapiantati con le stesse cellule a sette giorni dal trapianto.

La stessa analisi è stata inoltre effettuata sui midolli degli animali trapiantati con le cellule della coltura #9.1; non si è potuto osservare in questo caso alcuna differenza tra gli animali trapiantati e gli animali controllo.

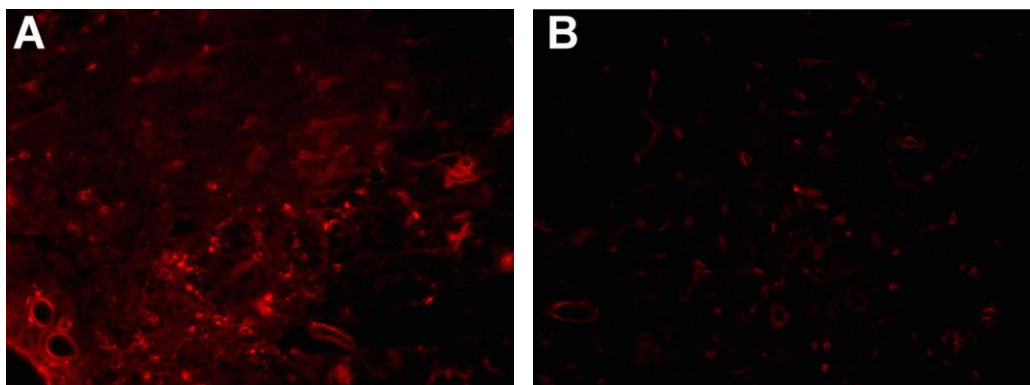


Fig.3.16: *Colorazione dei vasi mediante lectina. A: midollo trattato con cellule della coltura #3.6; B: midollo controllo, trattato con solo veicolo. L'immagine, ripresa mediante microscopia confocale, rappresenta una zona 2 mm a monte dell'epicentro di lesione.*

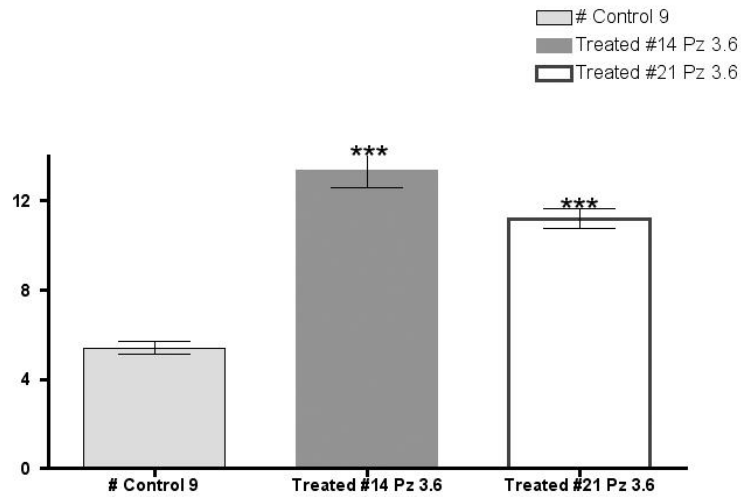


Fig.3.17: *Misurazione dei livelli di lectina in midolli trattati con cellule della coltura #3.6 e loro significatività rispetto al controllo.*
*I livelli di lectina dei midolli trattati con tali cellule risultano altamente significativi rispetto ai midolli controllo (*** $P < 0,001$).*

4. DISCUSSIONE

Il trauma spinale è una patologia devastante che colpisce migliaia di persone nel mondo, e ad oggi non esiste ancora una cura efficace per ripristinare almeno parzialmente le funzioni motorie ed autonome perdute. Il trattamento comunemente utilizzato della lesione spinale consiste tuttora nel trattamento chirurgico, per stabilizzare il sito di danno, alte dosi di corticosteroidi, per cercare di limitare il danno secondario e infine la terapia riabilitativa (Baptiste and Fehlings, 2007). Mentre questi trattamenti potrebbero fornire dei benefici, i miglioramenti clinici sono modesti, e molti pazienti devono convivere con notevoli disfunzioni e disabilità neurologiche.

Gli studi preclinci con agenti neuroprotettivi (come minociclina e gli antagonisti della proteina Rho) sono finora incoraggianti, e gli studi clinici con questi agenti farmacologici, inizieranno presto (Coutts and Keirstead, 2008).

La terapia cellulare, affiancata dalla terapia farmacologica, potrebbe costituire un promettente strumento per trattare le persone colpite dalla lesione spinale: la ricerca pre-clinica ha dimostrato l'efficacia di alcuni trattamenti basati sull'utilizzo di cellule staminali, anche se molti ostacoli significativi devono essere ancora superati prima che si possa passare alla clinica: tra questi, l'identificazione della più appropriata fonte di cellule staminali, l'ottimizzazione delle loro caratteristiche prima del trapianto, la riduzione dei rischi connessi alla terapia con le cellule staminali, lo sviluppo di tecnologie applicabili su larga scala e considerazioni di ordine regolatorio, che devono essere rispettate.

Le cellule staminali presentano notevoli potenzialità per il trattamento della lesione spinale, in quanto la somministrazione di esse potrebbe portare molteplici

effetti: la sostituzione delle cellule danneggiate, la possibilità di costituire un "ponte" per la trasmissione elettrica tra neuroni rostralmente e caudalmente alla lesione, il miglioramento del danno clinico e facilitare la rigenerazione, fornendo fattori neuroprotettivi o fattori di crescita; esse possono giocare inoltre altri ruoli indiretti, quali la promozione della neovascolarizzazione o la costituzione di un substrato che sia "permissivo" per la rigenerazione delle cellule endogene (Coutts and Keirstead, 2008).

In linea teorica, le cellule staminali più promettenti adatte a questo scopo, sarebbero le cellule staminali embrionali che, grazie alla loro elevata capacità differenziativa, potrebbero avere maggior possibilità di sopravvivere ed integrarsi nel tessuto nervoso danneggiato. Un'altra fonte particolarmente promettente, almeno in linea teorica, è rappresentata dalle cellule staminali neurali, che per la loro provenienza e predisposizione differenziativa potrebbero anch'esse costituire una buona fonte per un approccio clinico delle patologie traumatiche del midollo spinale (Bottai et al, 2003). Per quanto riguarda le cellule staminali embrionali, benché siano stati congelati numerosissimi embrioni negli scorsi anni (prodotti durante le terapie riproduttive), le grosse problematiche etiche connesse con il loro utilizzo in alcuni paesi ne riducono notevolmente la disponibilità.

Per queste ragioni, recentemente numerosi studi si sono indirizzati alla ricerca di nuove fonti di cellule dalle proprietà interessanti, che le rendessero utili in terapia e che non presentassero le problematiche etiche sopra citate.

Queste cellule possono derivare o dal feto stesso o dai tessuti extraembrionali, quali il sangue del cordone ombelicale, la gelatina di Wharton, la membrana amniotica, la placenta e, infine, il liquido amniotico. Il fatto che questi tessuti

siano di origine extra embrionale, contengano grandi masse di cellule e siano di facile accesso, rende questi tessuti delle fonti ideali per studiare le caratteristiche delle popolazioni "staminali" presenti al loro interno, presentando al contempo un numero molto minore di problematiche etiche.

In questo studio di dottorato abbiamo scelto di focalizzare la nostra attenzione sulle cellule provenienti da liquido amniotico al terzo trimestre, provenienti da parti cesarei programmati.

Gli studi presenti finora in letteratura, quasi unicamente riguardanti liquidi amniotici del secondo trimestre, indicano che le cellule staminali derivate da tale fonte presentano molte caratteristiche proprie delle cellule staminali embrionali quali l'espressione di marcatori di staminalità, come Oct-4, Nanog e SSEA-4 (De Coppi, 2007; Kim et al, 2007; Antonucci et al, 2010) o la capacità di autorigenerazione. Grazie inoltre alla loro capacità differenziativa, dimostrata sia *in vivo* che *in vitro* (De Coppi et al, 2007), tali cellule presentano caratteristiche di plasticità che le collocano tra la pluripotenza delle cellule staminali embrionali e la multipotenza delle cellule staminali adulte (Pappa et Anagnou, 2009).

Tali caratteristiche sono state da noi confermate mediante analisi sia in immunofluorescenza che Real-time PCR, da cui è emersa l'espressione del gene Oct-4 in tutte le colture studiate, tranne nella coltura #3.6; l'espressione di tale gene mostrava inoltre una diminuzione con l'aumentare dei passaggi e tale dato, che va di pari passo con la diminuzione della capacità proliferativa, suggerisce che tali cellule vadano via via, con l'aumentare del numero dei passaggi, perdendo la loro capacità proliferativa e raggiungano la senescenza.

Come già da tempo descritto in letteratura, le cellule da liquido amniotico costituiscono una popolazione cellulare estremamente eterogenea, derivate da tutti e tre i foglietti embrionali, e contiene tipi cellulari parzialmente differenziati, con caratteristiche diverse tra loro. Come mostrato in un recente studio, le cellule del liquido amniotico con età gestazionale minore, sembrano esprimere più alti livelli di marcatori endodermici e mesodermici rispetto a quelli con età gestazionale maggiore, mentre i marcatori di tipo ectodermico, invece, non mostrano alcuna differenza in base all'età gestazionale (Da Sacco et al, 2010; Pappa and Anagnou, 2007).

La procedura di isolamento a due step, descritta da Tsai e collaboratori nel 2004 e il metodo descritto da Fauza nel 2004, da noi utilizzato, hanno permesso in numerosi lavori l'isolamento e l'espansione clonale delle cellule presenti nel liquido amniotico e la loro caratterizzazione.

In numerosi lavori in letteratura è stato dimostrato che le cellule da liquidi amniotici al secondo trimestre esprimono tipici marcatori mesenchimali quali CD29, CD90, CD166, CD73, CD105 e CD49 (Tsai et al, 2004; Tsai et al, 2006; Prusa et al, 2003; Perin et al, 2008), sono positive per l'integrina VLA5 e marcatori endoteliali, quali CD44 e CD58; sono invece negative per marcatori ematopoietici quali CD45, CD34 e CD14, o marcatori della linea muscolare (Pappa and Anagnou, 2009). Le cellule del liquido amniotico esprimono inoltre, marcatori di tipo neurale, quali GFAP, β tubulina III, Neurofilamento H, sia allo stato nativo, che dopo essere state sottoposte a stimolazione neurogenica, caratteristica che le rende molto interessanti ai nostri scopi. Risultati analoghi sono stati da noi ottenuti: l'analisi delle colture isolate ha mostrato caratteristiche comuni: dopo

analisi per immunofluorescenza e Real-time PCR, le colture isolate mostravano la comune espressione di marcatori quali Nestina, GFAP, Neurofilamento H e β tubulina III, mentre invece tutte le colture risultavano negative per il marcatore Musashi-1.

Inoltre, per analisi al FACS, le colture analizzate presentavano un profilo tipico delle cellule mesenchimali, come mostrato dall'espressione di marcatori quali CD73, CD105, CD90, con un indirizzamento verso la linea muscolo neurale (CD146, NG2, CD56). Le colture mostravano invece una ridotta espressione di marcatori di tipo endoteliale (CD44, CD31, CD133), mentre erano praticamente assenti marcatori di tipo ematopoietico (CD45 o CD34) o epiteliali (Citocheratina 8-18, MUC-1, Caderina), con l'eccezione di due colture (#6.2 e #7.5) che presentavano una morfologia di tipo epitelioide.

Una delle colture (#3.6) mostra inoltre, in seguito ad analisi citofluorimetrica, l'espressione di un marcatore di notevole importanza, il marcatore CD117 (c-kit). Esso, marcatore caratteristico delle cellule staminali embrionali umane, delle cellule germinali primordiali e di molte cellule staminali somatiche, è stato già descritto in letteratura dal gruppo di De Coppi e collaboratori, come marker utilizzato per separare le cellule provenienti da liquido amniotico mediante immunoselezione, dimostrando poi in modo elegante ed esaustivo la loro "multipotenzialità ad ampio spettro" (De Coppi et al, 2007), sia *in vitro* che *in vivo*, in quanto in grado di differenziarsi verso i tipi cellulari corrispondenti a tutti e tre i foglietti embrionali. Le cellule sortate, inoltre, erano in grado di crescere per oltre 250 duplicazioni cellulari, mantenendo invariata la lunghezza dei telomeri, e un cariotipo normale.

Infine, dall'analisi citofluorimetrica da noi effettuata, è stato confermato un dato già riportato in studi precedenti su cellule da liquido amniotico: le cellule da noi isolate presentavano l'espressione di antigeni di istocompatibilità di classe I (HLA-ABC) ma non di classe II (HLA-DR) e questa risulta essere una caratteristica interessante, in quanto le rende poco immunogeniche e potrebbero dunque risultare più adatte ad un eventuale allotrapianto rispetto, ad esempio, alle cellule staminali neurali o del midollo osseo (Cananzi et al, 2009; Tsai et al, 2004; De Coppi et al, 2007).

Come effettuato dallo stesso De Coppi su cellule del secondo trimestre e in molti altri lavori, per studiarne le caratteristiche di "staminalità", abbiamo testato la loro capacità di differenziamento verso le linee mesenchimale (tessuto adiposo e osseo) e neurale, in presenza di appropriati stimoli differenziativi.

In presenza di medium adipogenico, tra le colture testate la coltura #3.5 ha mostrato il maggior potenziale differenziativo, come evidenziato dalla deposizione di grosse gocce lipidiche al suo interno (nel 2% delle cellule analizzate), mentre nella maggioranza delle colture sottoposte a differenziamento si è potuta apprezzare la formazione di gocce di piccole dimensioni. Inoltre, mediante Real-time PCR, si è potuta osservare, in tutti i campioni studiati, l'aumentata espressione rispetto ai controlli del gene PPAR- γ -C1 α e, nelle colture #3.5 e #9.1, del gene PPAR2, due geni importanti nel differenziamento adipogenico. La coltura #3.5 mostra inoltre, in condizioni differenziative, un aumentato del trascritto del gene che codifica per una proteina più tardiva, la leptina, caratteristica dell'adipocita maturo (Abbott, 2009; Rosen et al, 2000).

In presenza di stimoli osteogenici, la colorazione di Alizarin Red ha permesso di evidenziare la deposizione di cristalli di calcio in modo particolare nelle cellule della coltura #3.5 e mediante gli studi di Real-time PCR abbiamo potuto però rilevare, solo in una delle colture studiate, un aumento del gene per RunX2, indice dell'attivazione del processo di differenziazione osteogenica (Komori, 2009). Il protocollo di differenziamento utilizzato necessita tuttavia di essere ancora ottimizzato.

I dati preliminari ottenuti per la coltura #3.5 sono quindi finora incoraggianti, in quanto tale coltura ha poi mostrato, come discusso più avanti, l'induzione di un miglioramento del recupero motorio negli animali trapiantati.

Per quanto riguarda invece la stimolazione neurogenica, si è potuto apprezzare finora solo un cambiamento morfologico nelle cellule trattate, che assumevano una morfologia "spinosa" con lunghi processi, mentre non è stato possibile osservare, in seguito ad analisi per immunofluorescenza, un cambiamento nell'espressione di marcatori di tipo neurale quali GFAP e β tubulina III, che erano già presenti sulle cellule nel medium basale di crescita.

Da ultimo, in seguito all'analisi della lunghezza dei telomeri, molte delle colture analizzate hanno mostrato valori non sono molto lontani da quelli medi delle cellule staminali embrionali riportati in letteratura (Allen et al., 2009, Blasco M.A., 2007; Flores et al., 2006), che raggiungono in certi casi anche le dimensioni di 12-15 kb, e tale risultato ci fa quindi ben sperare circa le proprietà "staminali" delle colture analizzate.

Dopo averle caratterizzate, ci siamo dunque occupati dello studio del potenziale terapeutico delle cellule isolate nella terapia della lesione spinale.

Numerose strategie sono state tentate nel trattamento della lesione spinale e gli studi preclinici effettuati finora sono raccolti nella review di Steuer e Guertin, del 2009 (Steuer and Guertin, 2009). Tra queste strategie, molto importanti sono, a mio parere, lo studio della somministrazione dell'acido ialuronico, che ha come effetto una diminuzione dell'astrogliosi e della cicatrice astrogliale nella zona di lesione (Khaing et al, 2009) o lo studio degli effetti di VEGF e NGF nel ratto (Kim et al, 2009) e un grandissimo numero di studi che fanno uso di vari tipi di cellule staminali nel trattamento della lesione spinale: cellule staminali embrionali, staminali neurali, staminali del midollo osseo o staminali del sangue del cordone ombelicale (Steuer and Guertin, 2009).

Le potenzialità terapeutiche del liquido amniotico sono state finora studiate in svariati ambiti, quali infarto del miocardio, ischemia (Chiavegato et al, 2007; Delo et al, 2010), tumore, malattie genetiche (De Coppi, 2007; Yen et al, 2005), rigenerazione del nervo periferico e del nervo sciatico (Cheng et al, 2010), rigenerazione tissutale nell'ambito delle patologie renali (Da Sacco et al, 2010), rigenerazione della ghiandola mammaria (Klemmt et al, 2010), degenerazione muscolare (Mauro et al, 2010), malattie neurodegenerative e del sistema nervoso (Tsai et al, 2006) e diagnosi prenatale (Cananzi et al, 2009).

Le cellule del liquido amniotico non sono ancora state testate nella terapia della lesione spinale; invece, sono state utilizzate finora solo cellule epiteliali amniotiche estratte dalla placenta di parti cesarei (Wu et al, 2006; Sankar et al, 2003), e da questi studi sembra che le cellule trapiantate si integrino nel tessuto dell'ospite ed inducano un recupero motorio negli animali trapiantati.

Nello studio da noi effettuato, le cellule di quattro delle colture isolate sono state trapiantate, dopo marcatura citoplasmatica, mediante iniezione endovenosa nella vena della coda nei topi contusi.

Le cellule sono state rinvenute, anche se in numero molto esiguo, nel sito di lesione, mostrando quindi la loro capacità di migrare nel sito di lesione, nonostante la maggior parte di esse venga persa, a causa dello stato infiammatorio che si genera in seguito alla lesione, e per il fatto che molte di esse, comunque, raggiungono gli organi filtro.

Merita attenzione la scelta che abbiamo effettuato di trapiantare le cellule 1 settimana dopo la lesione, diversamente da quanto effettuato, ad esempio, in studi precedenti del nostro laboratorio, che utilizzavano cellule staminali di provenienza embrionale e neurale (Bottai et al, 2010; Bottai et al, 2008). Tale scelta è stata dettata da vari motivi. Primo tra tutti, vi è il problema dell'immunosoppressione, poiché gli animali, a partire dal giorno del trapianto, sono stati da noi immunosoppressi con dosi inizialmente molto alte di ciclosporina, poi via via decrescenti; se ciò venisse fatto il giorno stesso della lesione, la maggior parte degli animali risulterebbero talmente debilitati che molti di essi morirebbero per gli effetti della ciclosporina e della lesione. Inoltre, se il trapianto fosse effettuato poche ore dopo, questo da una parte permetterebbe alle cellule di poter agire durante la fase acuta e sub-acuta del danno, potendo così meglio esercitare il loro effetto protettivo sin dalle prime fasi ma, al contempo, molte di esse probabilmente verrebbero distrutte dagli eventi infiammatori stessi scatenatisi subito dopo la lesione. La scelta effettuata è quindi un tentativo di mediare i vari fattori in gioco.

Una settimana dopo la lesione, dunque, quattro delle linee cellulari isolate (#3.5, #3.6, #9.1 e #1.1) sono state trapiantate negli animali lesionati, e si è potuto osservare che le colture #3.5 e #3.6, entrambe di morfologia fibroblastoide, hanno dato luogo ad un recupero motorio significativamente superiore rispetto a quello fisiologico presente negli animali trattati con il solo veicolo (animali controllo). Questa differenza diventava significativa due settimane dopo il trapianto e si manteneva fino al sacrificio degli animali, a cinque settimane dalla lesione. Determinare quale sia il motivo di tale differente risultato è ancora oggetto del nostro studio, e risulta di cruciale importanza.

Mediante analisi istologica abbiamo osservato che solo un numero molto esiguo di cellule è stato rinvenuto nel sito di lesione. L'effetto di recupero motorio osservato non può dunque essere attribuito ad un effetto sostitutivo da parte delle cellule trapiantate, anche perché le cellule umane ritrovate nel sito di lesione presentavano lo stesso fenotipo che avevano in coltura e non mostravano l'espressione di marcatori neurali maturi. Si può forse parlare di un effetto neuroprotettivo esercitato da parte delle cellule umane trapiantate, che non si esercita però mediante una diminuzione dei livelli delle citochine proinfiammatorie analizzate, poiché non è stato possibile osservare variazioni dei livelli di esse nell'intorno della zona di lesione, diversamente da quanto osservato in altri studi condotti nel nostro laboratorio (Bottai et al 2008). Non è stato possibile osservare neppure una diminuzione del numero dei neutrofili e dei macrofagi nell'intorno della zona di lesione, né dopo 7 giorni né dopo 1 mese dal trapianto, e su questo dato ottenuto ha probabilmente inciso il tempo intercorso tra la lesione e il trapianto delle cellule, in quanto così facendo le cellule trapiantate non hanno

potuto esercitare il loro effetto "protettivo-antiinfiammatorio" nel corso della fase acuta dell'infiammazione.

Alla ricerca di una possibile spiegazione del recupero motorio osservato siamo andati, prendendo spunto da lavori precedenti effettuati con altri tipi di cellule nel nostro laboratorio, ad analizzare i livelli di mielina nella zona di lesione. Si è potuto osservare negli animali trapiantati con le colture #3.5 e #3.6, un mese dopo il trapianto, un aumento dei livelli di mielina nell'intorno dell'area di lesione, i cui livelli risultavano significativamente superiori rispetto ai controlli; non si sono potute osservare invece significative differenze tra animali trapiantati e animali controllo 1 settimana dopo il trapianto.

Il recupero motorio osservato potrebbe quindi essere attribuito ad un aumento della preservazione tissutale nella zona di lesione.

Dall'analisi citofluorimetrica effettuata, abbiamo potuto definire un differente profilo antigenico delle colture isolate: ad un commissionamento delle prime due colture (#3.5 e #3.6) verso la linea muscolo neurale, si contrappone un commissionamento delle altre due linee "non terapeutiche" verso la linea perivascolare, e questo potrebbe essere una prima possibile spiegazione del differente effetto osservato.

Dall'analisi dei tratti comuni alle due colture "terapeutiche", è emersa inoltre una comune espressione di alcuni marcatori che potrebbero rivestire un ruolo importante nell'induzione della loro azione terapeutica, quali l'espressione dei marcatori NG2 e CD105 ad alti livelli (~100%) e l'espressione nella coltura #3.6 di alti livelli del marcatore CD117. Dal punto di vista morfologico, inoltre, le due

culture “terapeutiche” sono accomunate dalla comune morfologia di tipo fibroblastoide.

Il marcatore NG2, un proteoglicano di membrana, è espresso nel sistema nervoso centrale da parte di sottopolazioni gliali, che presentano le caratteristiche di precursori oligodendrocitici, nel sistema nervoso centrale maturo e in corso di sviluppo. Tale marcatore è espresso inoltre su cellule della linea mesenchimale, come condrociti immaturi, osteoblasti, mioblasti, cellule staminali della pelle, cellule endoteliali in proliferazione, alcune linee di melanoma umano e in cellule tumorali nella leucemia linfoblastica acuta: esso sembra giocare un ruolo nella regolazione della motilità cellulare, nella crescita assonica e nelle risposte cellulari ad alcuni fattori di crescita (Stallcup et al, 2008). Ci sono evidenze sperimentali che il movimento dei periciti, che costituiscono la superficie esterna dei vasi, nella formazione di nuovi vasi sanguigni, coinvolga un complesso di proteine di superficie costituito da NG2 e altre proteine, quali galectina-3 e $\alpha 3\beta 1$, ed è stato ipotizzato che NG2 possa mediare la comunicazione tra i periciti e le cellule dell'endotelio vasale: è stata infatti osservata una ridotta migrazione in seguito all'utilizzo di anticorpi diretti contro le proteine implicate nel processo di formazione dei vasi (Karram et al, 2007). Infine, il proteoglicano NG2 sembra essere inoltre associato con strutture citoscheletriche.

Alla luce di ciò, l'espressione di tale marcatore sulla superficie delle cellule da noi isolate merita di essere ulteriormente indagato. La stretta relazione tra espressione di NG2 e la neovascolarizzazione (come mostrato ad esempio nel caso dello sviluppo del tumore (Stallcup et al, 2008)), ci ha suggerito di andare ad analizzare, nell'intorno dell'area di lesione, negli animali trapiantati e negli animali

controllo, la variazione del volume del letto vascolare dopo colorazione dell'endotelio vasale con lectina. I risultati ottenuti sono finora incoraggianti, in quanto, a 1 mese dal trapianto, si è potuto osservare un aumento dei livelli di vascolarizzazione negli animali trapiantati con le cellule delle colture #3.5 e #3.6 rispetto agli animali controllo. Nessuna differenza si è potuta invece osservare dopo trapianto della coltura #9.1 e neppure dopo una settimana dal trapianto delle colture #3.5 e #3.6.

Anche il coinvolgimento del marcatore CD105 richiede di essere ulteriormente indagato, in quanto tale molecola è una glicoproteina di membrana che risulta coinvolta in processi di proliferazione, differenziamento e migrazione cellulare (Warrington K, 2005; Marioni G, 2010).

Essa è espressa su linee cellulari del sistema vascolare, overespressa su cellule endoteliali proliferanti, ed è utilizzata dunque come marcatore di neovascolarizzazione e, come tale, anche come marker tumorale. Visto dunque il suo pattern di espressione, il coinvolgimento di tale molecola nei processi di rigenerazione da noi osservati in seguito a trapianto risulta degno di ulteriore indagine.

Concludendo, molte sono le fonti di cellule staminali utilizzabili per la terapia rigenerativa (staminali embrionali, adulte, fetali, etc.) e i metodi per generare cellule staminali pluripotenti (iPS). Ciascuno di essi presenta vantaggi e svantaggi, e ad oggi, non è ancora stato stabilito quale sia il miglior candidato da utilizzare nella terapia rigenerativa. Nonostante la migliore fonte di cellule per la terapia cellulare vari probabilmente a seconda del contesto clinico, la recente scoperta di una nuova fonte di cellule di derivazione fetale nel liquido amniotico, che

presentano un fenotipo comparabile con quello delle cellule mesenchimali del midollo osseo, sono più facili da isolare, mostrano migliori capacità proliferative e non presentano grosse limitazioni di carattere etico, apre nuovi orizzonti nella medicina rigenerativa (In't Anker, 2004; Cananzi et al, 2009). In aggiunta, il rischio comportato dalla pratica dell'amniocentesi potrebbe essere eliminato, come recentemente dimostrato da alcuni ricercatori: è infatti attualmente possibile individuare dall'analisi del sangue materno la presenza di eventuali anomalie fetali, evitando così di ricorrere a pratiche quali amniocentesi o l'analisi dei villi coriali, che presentano un certo livello di rischio per la madre e per il feto (Lun et al, 2008; Wright and Burton, 2009; Hall et al, 2010).

Questo scenario concentra ulteriormente l'interesse sullo studio delle potenzialità delle cellule provenienti da parti a termine, per poterne così sfruttare le potenzialità e renderle al più presto utilizzabili in clinica. Per fare ciò, necessitano di essere ancora chiarite molte questioni che riguardano la loro origine, stato epigenetico, immunogenicità, capacità di proliferazione e di differenziamento.

5. BIBLIOGRAFIA

Abbott, BD (2009) Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR α), beta (PPAR β), and gamma (PPAR γ) in rodent and human development. *Reproductive Toxicology* (3-4): 246-257.

Akesson E, Holmberg L, Jonhagen ME et al. (2001) Solid human embryonic spinal cord xenografts in acute and chronic spinal cord cavities: a morphological and functional study. *Experimental Neurology* 170: 305-316.

Allen ND, Baird DM (2009) Telomere length maintenance in stem cell populations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1792: 324-328.

Andersson AJ (2002) Mechanism and pathways of inflammatory responses in CNS trauma: spinal cord injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine* 25: 70-79.

Anderberg L, Aldskogius H, Holtz A (2007) Spinal cord injury - scientific challenges for unknown future. *Uppsala Journal of Medical Sciences* 112: 259-288.

Antonucci I, Stuppia L, Kaneko Y et al. (2010) Amniotic Fluid as Rich Source of Mesenchymal Stromal Cells for Transplantation Therapy. *Cell Transplant* [ahead of print]

Apuzzo ML (2002) Pharmacological therapy after spinal cord injury. *Neurosurgery* 50 S: 63-72.

Baptiste DC, Fehlings MG (2006) Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma* 23: 318-334.

Baptiste DC and Fehlings MG (2007) Update on the treatment of spinal cord injury. *Progress in Brain Research* 161 (15):217-233.

Blasco MA (2007) Telomere length, stem cells and aging. *Nature Chemical Biology* 10: 640-648.

Blits B, Bunge MB (2006) Direct gene therapy for repair of the spinal cord. *Journal of Neurotrauma* 23: 508-520.

Bossolasco P, Montemurro T, Cova L et al. (2006) Molecular and phenotypical characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Research* 16: 329-336.

Bottai D, Fiocco R, Gelain F et al. (2003) Neural stem cells in the adult nervous system. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 12: 655-670.

Bottai D, Madaschi L, Di Giulio AM, Gorio A (2008) Viability-dependent promoting action of adult neural precursors in spinal cord injury. *Molecular Medicine* 14: 634-644.

Bottai D, Cigognini D, Madaschi L et al. (2010) Embryonic stem cells promote motor recovery and affect inflammatory cell infiltration in spinal cord injured mice. *Exp Neurol* 223(2):452-63.

Bradbury EB, Moon LD, Popat RJ (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416: 636-640.

Brewer KL, Bethea JR, Yeziarski RP (1999) Neuroprotective effects of Interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. *Experimental Neurology* 159: 484-493.

Bush SA, Silver J (2002) The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Current Opinion in Neurobiology* 17: 120-127.

Cananzi M, Atala A, De Coppi P (2009) Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. *Reproductive BioMedicine Online* 18 (1): 17-27.

Cao Q, Xu XM, Devries WH et al. (2005) Functional recovery in traumatic spinal cord injury after transplantation of multilineurotrophin-expressing glial-restricted precursor cells. *Journal of Neuroscience* 25: 6947-6957.

Cardenas DD, Ditunno J, Graziani V et al. (2007) Phase 2 trial of sustained-release fampridine in chronic spinal cord injury. *Spinal Cord* 45: 158-168.

Carraro G, Perin L, Sedrakyan S et al. (2008) Human amniotic fluid stem cells can integrate and differentiate into epithelial lung lineages. *Stem Cells* 26(11):2902-11.

Cheng FC, Tai MH, Shu ML et al. (2010) Enhancement of regeneration with glia cell line-derived neurotrophic factor-transduced human amniotic fluid mesenchymal stem cells after sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg* 112(4):868-879.

Chiavegato A, Bollini S, Pozzobon M et al. (2007) Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42: 746-759.

Cipriani S, Bonini D, Marchina E et al. (2007) Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. *Cell Biology International* 31: 845-850.

Da Sacco S, Sedrakyan S, Boldrin F et al. (2010) Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications.

Dasari VR, Spomar DG, Gondi CS et al. (2006) Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 24: 391-410.

De Coppi P, Bartsch G, Siddiquil MM et al. (2007) Isolation of amniotic stem cells lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology* 25: 100-106.

Delo DM, De Coppi P, Bartsch G, Atala A (2006) Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods in Enzymology* 419: 426-438.

Delo, DM, Guan X, Wang Z et al. (2010) Calcification after myocardial infarction is independent of amniotic fluid stem cell injection. *Cardiovasc Pathol* [ahead of print]

Enzmann GU, Benton RL, Talbott JF et al. (2006) Functional considerations of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair. *Journal of Neurotrauma* 23: 479-495.

Erdo F, Buhle C, Blunk J et al. (2003) Host dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:780-5

Fauza D (2004) Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 18: 877-891.

Fawcett JW (2006) The glial response to injury and its role in the inhibition of CNS repair. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 557: 11-24.

Fernandes KJ, Toma JG, Miller FD (2008) Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 12: 185-198.

Feron F, Perry C, Cochrane J et al. (2005) Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain* 128: 2951-2960.

Flores I, Benetti R, Blasco MA (2006) Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Current Opinions in Cell Biology* 18: 254-260.

Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S et al. (2002) Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 14: 9450-9455.

Gorio A, Torrente Y, Madaschi L et al. (2004) Fate of autologous dermal stem cells transplanted into the spinal cord after traumatic injury. *Neuroscience* 125: 179-189.

Gosden CM (1983) Amniotic fluid cell types and culture. *British Medical Bulletin* 39: 348-354.

Hagg T and Oudega M (2006). Degenerative and Spontaneous Regenerative Process after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma* 23(3/4): 264-280.

Hall A, Bostanci A, Wright CF (2010) Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free fetal DNA technology: applications and implications. *Public Health Genomics* 13:246-255.

Hawryluk GWJ, Rowland J, Knon BK et al. (2008) Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury. *Neurosurg Focus* 25 (5):E14.

Huang DW, McKerracher L, Braun PE, David S (1999) A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 24: 639-647.

In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C et al. (2004) Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22: 1338-1345.

Jackson H, Muhammad O, Daneshvar H et al. (2007). Quantum dots are phagocytized by macrophages and colocalize with experimental gliomas. *Neurosurgery* 60: 524-529.

Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L et al. (1999) Neural stem cells in the adult human brain. *Experimental Cell Research* 253: 733-736.

Jones TB, Ankeny DP, Guan Z et al. (2004) Passive or active immunization with myelin basic protein impairs neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury rats. *The Journal of Neuroscience* 24: 3752- 3761.

Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A et al. (2001) The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery* 36: 1662-1665.

Kaviani A, Guleserian K, Perry TE et al. (2003) Fetal tissue engineering from amniotic fluid. *Journal of the American College of Surgeons* 196: 592-597.

Keirstead HS, Nistor GI, Bernal G et al. (2005) Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 25: 4694-4705.

Khaing ZZ, Vanscoy JE, Seidlits SK et al. (2009) Implantation of engineered hyaluronic acid scaffolds attenuate inflammatory cell response and glial scar after SCI. *Cell Transplant* 18: 220-221.

Kim J, Lee Y, Kim H et al. (2007) Human amniotic -derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Proliferation* 40: 75-90.

Kim HM, Hwang DH, Lee JF et al. (2009) Ex Vivo VEGF Delivery by Neural Stem Cells Enhances Proliferation of Glial Progenitors, Angiogenesis, and Tissue Sparing after Spinal Cord Injury. PLoS One 4(3):e4987.

Klemmt PA, Vafaizadeh V, Groner B. (2010) Murine amniotic fluid stem cells contribute mesenchymal but not epithelial components to reconstituted mammary ducts. Stem Cell Res Ther 1(4):20.

Komori T (2009) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. Cell and Tissue Research 339: 189–195.

Lea YS, Hsiao I, Lin VW (2002) Peripheral nerve grafts and aFGF restore partial hindlimb function in adult paraplegic rats. Journal of Neurotrauma 19: 1203-1216.

Lee H, Shamy GA, Elkabetz Y, et al. (2007) Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. Stem Cells 25:1931-9.

Li Y, Decherchi P, Raisman G (2003) Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. Journal of Neuroscience 23: 727-731.

Loy DN, Crawford CH, Darnall JB, et al. (2002) Temporal progression of angiogenesis and basal lamina deposition after contusive spinal cord injury in the adult rat. J Comp Neurol 445, 308-324.

Lun FM, Tsui NB, Chan KC et al. (2008) Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci U S A 105(50):19920-5.

Mabon PJ, Weaver LC, Dekaban GA (2000) Inhibition of monocyte/macrophage migration to a spinal cord injury site by an antibody to the integrin α D: a potential new anti-inflammatory treatment. *Experimental Neurology* 166: 52-64.

Marioni G, D'Alessandro E, Giacomelli L, Staffieri A (2010) CD105 is a marker of tumour vasculature and a potential target for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 39(5): 361–367.

Mauro A, Turriani M, Ioannoni A et al. (2010) Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. *Vet Res Commun* 34 (1):S25-28.

Mitsui T, Shumsky JS, Lepore AC et al. (2005) Transplantation of neuronal and glial restricted precursors into contused spinal cord improves bladder and motor functions, decreases thermal hypersensitivity, and modifies intraspinal circuitry. *Journal of Neuroscience* 25: 9624-9636.

Nandoe Tewarie RD, Hurtado A, Levi AD et al. (2006) Bone marrow stromal cells for repair of the spinal cord: towards clinical application. *Cell Transplantation* 2006 15: 563-577.

Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO (2002) Differential effects of neurotrophins on neuronal survival and axonal regenerations after spinal cord injury in rats. *The Journal of Comparative Neurology* 452: 255-263.

Pappa KI and Anagnou NP (2009) Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regenerative Medicine* 4: 423-433.

Park D, Eve DJ, Chung Y et al. (2010) Regenerative Medicine for Neurological Disorders. *TheScientificWorldJOURNAL* 10: 470-489.

Perin L, Sedrakyan S, Da Sacco S, De Filippo R (2008) Characterization of human amniotic fluid stem cells and their pluripotential capability. *Methods in Cell Biology* 86: 85-99.

Pinaud F, Michalet X, Bentolila LA et al. (2006) Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials* 27: 1679-1687.

Prusa AR, Marton E, Rosner M et al. (2003) Oct-4 expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Human Reproduction* 18: 1489-1493.

Riess P, Molcanyi M, Bentz K et al. (2007) Embryonic stem cell transplantation after experimental traumatic brain injury dramatically improves neurological outcome, but may cause tumors. *Journal of Neurotrauma* 24: 216-225.

Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P et al. (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Development* 14: 1293-307.

Rosenzweig ES, McDonald JW (2002) Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair. *Current Opinion in Neurology* 17: 121-131.

Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A et al. (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427(6976):740-4.

Sankar U, Muthusamy R (2003) Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. *Neuroscience* 118: 11-17.

Scheff SW, Rabchevsky AG, Fugaccia I et al. (2003) Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *Journal of Neurotrauma* 20: 179-193.

Schmidt D, Achermann J, Odermatt B et al. (2007) Prenatally fabricated autologous human living heart valves based on amniotic fluid derived progenitor cells as single cell source. *Circulation* 116: 64-70

Schwarz SC and Schwartz J (2010) Translation of stem cell therapy for neurological diseases. *Translational Research* 156 (3): 155-160.

Sonmez A, Kabakci B, Vardar E (2007) Erythropoietin attenuates neuronal injury and potentiate the expression of pCREB in anterior horn after transient spinal cord ischemia in rats. *Surgical Neurology* 68: 297-303.

Stallcup WB and Huang FJ (2008) A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression.

Steuer I and Guertin PA (2009) Spinal cord injury research in mice: 2008 review. *TheScientificWorldJOURNAL* 9, 490-498.

Steward O, Zheng B, Tessier-Lavigne M (2003) False resurrection: distinguishing regenerated from spared axons in the injured central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 459: 1-8.

Thuret S, Moon LD, Gage FH (2006) Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature* 7: 628-643.

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ et al. (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology* 3: 778-784.

Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD (2005) Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 23: 727-737.

Tsai MS, Lee JL, Chang YJ et al. (2004) Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol 19(6):1450-6.

Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL et al. (2006) Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod* 74(3):545-551.

Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L et al. (2007) Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience* 144, 865-877.

Warrington K, Hillarby MC, Li C et al. (2005) Functional role of CD105 in TGF-beta1 signalling in murine and human endothelial cells. *Anticancer Res.* 25(3B):1851-64.

Weibel ER (1979) *Stereological Methods. Practical Methods for Biological Morphometry. Vol I*, Academic Press, New York.

Wright CF and Burton H (2009) The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 15(1):139-51.

Wu ZY, Hui GZ, Lu Y et al. (2006) Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury. *Chinese Medical Journal* 119: 2101-2107.

Xu XM, Chen A, Guenard V et al. (1997) Bridging Schwann cell transplants promote regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult spinal cord. *Journal of Neurocytology* 26: 1-16.

Yamashita T, Fujitani M, Yamagishi S et al. (2005) Multiple signals regulate axon regeneration through the nogo receptor complex. *Molecular Neurobiology* 32: 105-111.

Yen, BL, Huang HI, Chien CC et al. (2005) Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* 23(1):3-9.

You Q, Cai L, Zheng J et al. (2008) Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, in press.